Botanische Untersuchung harnstoffspaltender Bakterien

mit besonderer Berücksichtigung
der speziesdiagnostisch verwertbaren Merkmale
und des Vermögens der Harnstoffspaltung

Teildruck

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Philosophischen Fakultät der Universität Marburg

vorgelegt von

Arno Viehoever

aus Wiesbaden

vorm. Assistenten am Botanischen Institut der Universität Marburg

Mit 22 Textfiguren

Marburg 1913

Botanische Untersuchung harnstoffspaltender Bakterien

mit besonderer Berücksichtigung
der speziesdiagnostisch verwertbaren Merkmale
und des Vermögens der Harnstoffspaltung

Teildruck

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Philosophischen Fakultät der Universität Marburg

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

vorgelegt von

Arno Viehoever

aus Wiesbaden

vorm. Assistenten am Botanischen Institut der Universität Marburg

Mit 22 Textfiguren

Marburg 1913

Angenommen von der philosophischen Fakultät am 15. Juli 1913

Berichterstatter: Geheimrat Prof. Dr. A. Meyer

Die Dissertation erscheint vollständig mit 2 Tafeln im Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. II. Abteilung. Herausgegeben von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin, Verlag von Gustav Fischer in Jena. 39. Band. 1913. Nr. 8/14.

Meinen Lieben

Inhaltsangabe.

Einleitung.

Seite

Zusammenstellung der wichtigsten Resultate . . . . . 1—4

Kapitel 1.

Allgemeines über Harnstoffbakterien und Sporenbildungsvermögen . . . . . 4—17
Geschichtliches 4
Vorkommen, Gewinnung und Reinzucht 5
Auswahl der günstigsten Zusammensetzung und Reaktion des Nährbodens. . 6— 9
Allgemeine Vorbehandlung . . . . . 9—10
Weiterzucht 10
Abhängigkeit des Sporenbildungsvermögens von äußeren Faktoren . . . . . 11—17

Kapitel 2.

Allgemeine Morphologie . . . . . 17—36
Methode der Größenmessung 18
Form, Größe und Inhaltstoffe der Morphoden . . . . . 17—24
Verhalten gegen osmotische Lösungen . . . . . 24—25
Verhalten gegen Farblösungen; Geißelfärbung, Gram dauer, Säurefestigkeit, Giemsa-Färbung, Chitin-Nachweis . . . . . 25—32
Verhalten im Ultramikroskop 32
Gewinnung einer Einzell-Kultur . . . . . 32—36
Eigenschaften der Einzell-Kultur 36

Kapitel 3.

Kulturelle Eigenschaften . . . . . 36—42
Wachstum und Entwicklungsgeschichte auf festen Nährböden. . . . . 36—39
Wachstum und Entwicklungsgeschichte in flüssigen Nährböden . . . . . 39—42
Verwertbarkeit von Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen . . . . . 42—52

Kapitel 4.

Biophysikalische Eigenschaften . . . . . 52—60
Verhalten der Morphoden gegen Temperatur und Sauerstoff . . . . . 52—56
Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen hohe Temperaturen 56
Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Gifte und Säuren . . . . . 56—58
Widerstandsfähigkeit der Oidien gegen Gifte . . . . . 58—60

Kapitel 5.

Biochemische Eigenschaften . . . . . 60—73
Stoffwechselprodukte bekannter Art: NH_3, H_2S, HNO_2 usw. . . . . 60—67
Kristallbildung und Iriserscheinung . . . . . 66—67
Enzyme . . . . . 67—73

Kapitel 6.

Tierversuche . . . . . 73—74
Pathogenität und Giftbildung . . . . . 73—74

Kapitel 7.

Allgemeines und Methodisches über Harnstoffspaltung . . . . . 74—80
Anordnung und Vorbereitung der Versuche . . . . . 74—76
Methoden der Ammoniakbestimmung . . . . . 77—79
Methode der Harnstoffbestimmung . . . . . 79—80

Kapitel 8.

Allgemeines und Methodisches über Bakterienzählung . . . . . 80—89
Apparate und Reagentien zur Bakterienzählung . . . . . 80—84
Vorbereitung und Ausführung der Zählversuche . . . . . 84—89

Kapitel 9.

Bestimmuug der Harnstoffspaltungs- und der Vermehrungsgröße . . . . . 89—108
Abhängigkeit der Spaltungsgröße von Kultur- und Impfverhältnissen . . . 89— 99
Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Vermehrungsgröße . . . . . 99—108

Kapitel 10.

Beschreibung der mir übermittelten Originalkulturen anderer Autoren und ihr Vergleich mit meinem Originalstamm . . . . . 108—133
Vergleich der kulturellen und morphologischen Eigenschaften . . . . . 108—114
Vergleich der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften . . . . . 115—117
Vergleich der Harnstoffspaltungsgrößen und der Vermehrungsgrößen. . . . 117—133

Kapitel 11.

Kritische Literaturübersicht über harnstoffspaltende Bakterien . . . . . 133—142
Sporenbildende Harnstoffbakterien . . . . . 133—140
Nichtsporenbildende Harnstoffbakterien . . . . . 141—142

Kapitel 12.

Zusammenstellung der wichtigsten Merkmale der Spezies „Bacillus probatus A. M. et Viehoever“ mit besonderer Berücksichtigung der Eigenschaften meines Originalstammes A. . . . . 142—146

Literaturverzeichnis . . . . . 146—150

Tafelerklärung . . . . . 150—151

Einleitung.

Zusammenstellung der wichtigsten Resultate.

Vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1909—1913 unter Leitung von Herrn Professor Meyer im Botanischen Institut zu Marburg ausgeführt.

Es war ihre allgemeine Aufgabe, die Morphologie und Physiologie der harnstoffspaltenden sporenbildenden Spezies der Gattung Bacillus zu fördern. Sie sollte zuerst den Fehler vieler ähnlicher Arbeiten vermeiden, bei den physiologischen Untersuchungen unbestimmbare, also nicht mehr wiederzufindende Bakterien als Versuchsobjekte zu benutzen. Arbeiten, die mit solchem, nicht sicher wieder aufzufindendem Material gemacht wurden, haben stets nur einen zweifelhaften Wert, denn sie sind nicht kontrollierbar und es ist meist kein sicheres Weiterbauen auf den mit ihnen gewonnenen Resultaten möglich.

Die Arbeit sollte ferner ganz allgemein eine exakte systematische Kenntnis der harnstoffspaltenden Spezies begründen helfen. Der Vorgang der Harnstoffspaltung sollte genauer untersucht werden, vorzüglich sollte auch die Frage beantwortet werden, ob die Energie der Harnstoffspaltung von der Einheit des Protoplasten der betreffenden Spezies abhängig und durch äußere Faktoren beeinflußbar sei.

Von den Resultaten der Arbeit mögen die folgenden kurz hervorgehoben werden:

Die mir durch die Freundlichkeit der Herren Professoren Beijerinck, Löhnis und Král zugänglich gemachten Stämme:

1. Urobacillus pasteurii Miquel, Originalstamm Beijerinck;

2. Urobacillus leubei Beijerinck, Originalstamm Beijerinck, von Král bezogen;

3. Bacillus Pasteuri (Miquel) Migula, Originalstamm B_2 Löhnis erwiesen sich als identisch mit der von mir isolierten und von uns jetzt Bacillus probatus A. M. et Viehoever genannten Spezies.

Etwas abweichend von unserer Spezies verhielt sich die mir von Herrn Professor Löhnis freundlicherweise übermittelte Kultur der Spezies:

Bacillus Freudenreichii (Miquel) Migula, Originalstamm I Löhnis, die deshalb als besondere Spezies betrachtet werden soll, möglicherweise aber doch noch zu unserer Spezies gehört.

Zu unserer Spezies Bacillus probatus gehören wahrscheinlich die folgenden, nicht mehr in Originalkulturen zu erhaltenden Formen, welche wenigstens eine Anzahl von diagnostischen, für die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechenden Merkmalen, dagegen kein wesentlich davon abweichendes Merkmal besitzen. Die Spezies sind nicht genügend genau beschrieben und deshalb zu streichen:

1. Bacillus ureae α = Urobacillus Madoxii Miquel.
2. „ „ γ = „ Freudenreichii Miquel.
3. „ „ β = „ Duclauxii Miquel.
4. „ „ ϱ = „ pasteurii Miquel.
5. „ „ δ = „ δ Miquel.
6. „ „ ε = „ ε Miquel.
7. „ „ Stamm II Burri.
8. „ „ „ III „
9. Bacterium ureae = Bacillus ureae (Leube) Günther.
10. Die sporenbildenden Harnstoff-spaltenden Bakterien von Rochaix et Dufourt.

Die Spezies Bacillus probatus A. M. et Viehoever zeigte unter anderem die nachfolgenden Eigenschaften:

Harnstoffspaltungsvermögen: Gehen wir von 10 Millionen Sporen der verschiedenen Stämme unserer Spezies aus, als Impfmaterial in 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff und lassen wir die Kulturen 20—50 Stunden bei 28° stehen, so ist die Größe der Harnstoffspaltung annähernd proportional der gefundenen Oidienzahl (der Zählung der Oidien wurde möglichst die durchschnittliche Sporangiengröße zugrunde gelegt):

Stäbchenzahl in Millionen	Gespaltene Harnstoffmenge in g
2076	0,0
2877	0,075
3165	0,084
3618	0,144
3782	0,168
4586	0,327

Die Vermehrungs- und Spaltungsgröße in 2-proz. Harnstoffbouillon ist also folgende:

Bei rund 2100 Millionen Stäbchen sind gespalten rund 0%
„ „ 2900 „ „ „ „ „ 19%
„ „ 3200 „ „ „ „ „ 21%
„ „ 3600 „ „ „ „ „ 36%
„ „ 3800 „ „ „ „ „ 42%
„ „ 4600 „ „ „ „ „ 82%

des zugesetzten Harnstoffs.

Daraus geht hervor, daß die Harnstoffspaltung erst nachweisbar wird, wenn mehr als 2000 Millionen Stäbchen gebildet sind. Nehmen wir an, daß bei 2500 Stäbchen eben Ammoniak nachzuweisen ist, so finden wir für weitere je 500 Millionen Stäbchen etwa 20 Proz. Harnstoff zersetzt: bei 3000 = 20 Proz., bei 3500 = 40 Proz., bei 4500 = 80 Proz. des zugesetzten Harnstoffs. Das Verhältnis der Stäbchenzahl zur Harnstoffspaltungsgröße konnte weder durch längere Fortzüchtung auf harnstoffreiem oder harnstoffhaltigem Nährboden, noch bei Durchführung der Spaltung in verschiedenen Nährböden beträchtlich verschoben werden. Auch vorbehandelnde Züchtung bei der für die Sporenbildung maximalen Temperatur oder die Vornahme der Gärung bei dieser Temperatur konnten das Verhältnis der Stäbchenzahl zur Harnstoffspaltungsgröße nicht merklich verändern.

Alle Verminderungen oder Vermehrungen der Ammoniakproduktion aus

Harnstoff ließen sich auf die verschieden große Schnelligkeit der Oidienvermehrung zurückführen.

Auch die folgenden Beobachtungen, welche die Spezies als wahrscheinlich autotroph erscheinen lassen, sind von Wichtigkeit: Die Spezies kann zu den Nitritbakterien gerechnet werden, denn sie vermag Ammoniak in Nitrit zu verwandeln. Die Spezies kann anscheinend (siehe die diesbezüglichen Versuche mit meinem Originalstamm) in stickstoffreier mineralischer Nährlösung noch wachsen, wenn diese als Stickstoffquelle nur Ammoniumkarbonat enthält, und demnach ihren Kohlenstoffbedarf zur Not aus dem Ammonkarbonat decken. Die Spezies wächst sicher kräftiger als autotroph mit Ammoniak und Asparagin und noch viel besser mit Ammoniak und Pepton saprophytisch, kann jedoch in mineralischer M-Nährlösung nicht wachsen, wenn diese nur unzersetzten Harnstoff enthält oder die Stoffe: Glykokoll, Leuzin, Azetamid, Oxamid, Succinimid, Harnsäure, Urethan, Kreatin, Kreatinin, Guanidin, Thioharnstoff.

Besondere Aufmerksamkeit wurde auch der Frage zugewandt, ob es möglich sei, den dauernden Verlust des Sporenbildungsvermögens bei Erhaltung der vegetativen Entwicklungsmöglichkeit herbeizuführen. Zu diesem Zwecke züchtete ich das Bakterienmaterial meines Originalstammes lange Zeit auf künstlichen Nährböden, impfte es dabei in verschieden langen Abständen über, immer ohne es vorher abzukochen; die Kulturen wurden bei günstigen und ungünstigen, z. T. maximalen Temperaturen gehalten. In anderen Versuchen wurden dem Nährboden Gifte, Soda, Ammonkarbonat oder Harnstoff in verschieden großen Mengen zugesetzt. Es gelang jedoch in keinem Falle, den dauernden Verlust des Sporenbildungsvermögens herbeizuführen: entweder trat eine so starke allgemeine Schwächung ein, daß auch das Entwicklungsvermögen dauernd aufgehoben wurde oder es gelang nachträglich, durch Züchtung bei optimalen Bedingungen wieder Sporen zu erhalten.

Interessant ist auch das Ergebnis, daß bei häufiger Überimpfung nicht abgekochten Materials unter Berücksichtigung der optimalen Kulturbedingungen eine allgemeine Stärkung der Stämme eintrat. Das Tuscheverfahren von Burri zur Isolierung von Einzelzellen wurde vereinfacht, da eingehende Versuche keine bemerkenswerte Schädlichkeit der Pelikantusche (Günther Wagner, Hannover) für Bakterien ergaben.

Schließlich erwähne ich noch kurz die Versuche, welche ich über die Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Gifte (Zinksulfat und Kaliumdichromat) und gegen Säuren (Salzsäure und Schwefelsäure) gemacht habe. Ich benutzte dabei folgende einfache Methode, bei der eine Wachstumshemmung, durch etwa im Sporenmateriale zurückgebliebene Gift- oder Säurereste hervorgerufen, kaum in Betracht kam, wenn dieses sorgfältig genug ausgewaschen war: Das ausgereifte Sporenmaterial wurde in Spitzgläschen mit bestimmten Mengen der Säure oder der Giftlösung bekannter Konzentrationen zusammengebracht, zur gleichmäßigen Verteilung öfters geschüttelt und die Mischung nach bestimmten Zeitabständen bis zur völligen Klärung zentrifugiert. Nach Entfernung der Giftlösung wurde der Sporenrest mehrere Male unter Zuhilfenahme der Zentrifuge mit sterilem Wasser ausgewaschen, bis auf chemischem Wege nichts mehr von den Zusätzen nachweisbar war, eine Öse des Sporenmaterials dann in optimale Kulturbedingungen übertragen und auf dem Nährboden schließlich der Eintritt der Sporenkeimung oder des sichtbaren Wachstums verfolgt.

Es stellte sich dabei heraus, daß die Sporen getötet waren, als sie 106

Minuten mit 16 Proz. Schwefelsäure und 40 Minuten mit 25proz. Salzsäure bei 28° in Berührung waren; dagegen blieben die Sporen noch entwicklungsfähig nach einer Einwirkung von 16 Proz. Schwefelsäure während 50 Minuten bei 28°, von 16 Proz. Salzsäure während 10 Minuten bei 28°, von nahezu 30-proz. Zinksulfatlösung während 8 Stunden bei 28° und während 3 Wochen bei ca. 17°, von nahezu 15-proz. Kaliumdichromatlösung während 8 Tagen bei 28° C.

Den Herren Professor Beijerinck-Delft, Dr. Christensen-Kopenhagen, Professor Ficker-Berlin, Dr. Söhngen-Middelburg und besonders Herrn Professor Löhnis-Leipzig möchte ich für die Überlassung von Originalkulturen, den Herren Professor Kutscher-, Dr. Berlin- und Dr. Engeland-Marburg für die freundliche Unterstützung bei tierphysiologischen Versuchen auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen. Für briefliche Auskunft bin ich den Herren Professoren Burri in Bern-Liebefeld, Leube-Würzburg, Dr. Liebert-Helden und Professor Miquel-Paris zu Dank verpflichtet.

Kapitel 1.

Geschichte, Vorkommen, Gewinnung, Vorkultur und Weiterzucht, Abhängigkeit des Sporenbildungsvermögens von äußeren Faktoren.

Geschichtliches.

Es ist eine allbekannte Erscheinung, daß Menschen- oder Tierharn bei längerem Stehen an der Luft trübe wird, und daß diese trübe Flüssigkeit bald einen unangenehm starken Geruch nach Ammoniak entwickelt.

Die Ursache dieser eigentümlichen Veränderung des Harnes blieb jedoch bis vor rund 50 Jahren trotz jahrhunderterlanger Forschung unaufgeklärt. Wohl war es gelungen, den Harnstoff aus dem Harne zu gewinnen und rein darzustellen; auch den Zerfall des Harnstoffes in Ammoniak und Kohlensäure bei der Harnfäulnis hatte man erkannt. Man wußte jedoch damit noch nichts über die Entstehung der ammoniakalischen Harngärung, nichts über die Ursache des Harnstoffzerfalls. Hierüber schafften erst die Arbeiten Pasteurs Klarheit.

Pasteur machte im Jahre 1860 (p. 849) darauf aufmerksam, daß gekochter Harn in zugeschmolzenen Röhren unzersetzt blieb, durch Luftstaub aber unter Ammoniakentwicklung zersetzt wurde; in der Flüssigkeit fand er Bakterien, Pilze und Infusorien. 2 Jahre darauf (1862, p. 50—57) beschrieb dieser Forscher dann als Erreger der Harngärung ein kugeliges Lebewesen, das er Torule ammoniacale nannte. Van Tieghem kam etwas später (1864, l. u. 2., p. 210—264) bei dem Studium der Gärung des Harnes und künstlicher Harnstofflösungen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß vorwiegend „Kokken" zur Harnstoffspaltung befähigt seien.

Miquel (s. Literaturverzeichnis) beschäftigte sich vom Jahre 1878 an bis zum Jahre 1898 eingehend mit den Erregern des Harnstoffabbaues; er wies in zahlreichen Einzelarbeiten und zusammenfassend 1898 in seinem Buche „Étude de la fermentation ammoniacale", 1904 in Lafars Handbuch der technischen Mykologie (Bd. 3, p. 71ff.) darauf hin, daß außer kokkenförmigen auch eine große Anzahl stäbchenförmiger Bakterien, ja selbst Fadenpilze die Fähigkeit haben, den Harnstoff zu zerlegen. Diese Eigenschaft hatten auch stäbchenförmige Bakterien, die Leube (1885, p. 558—562) in Gemeinschaft mit Graser aus Harn isolierte und beschrieb.

Burri, Herfeldt und Stutzer (1895, p. 329) züchteten aus Torfmull drei, ihrer Angabe nach, verschiedene Bakterienarten mit gleicher Fähigkeit. Beijerinck erweiterte dann 1901 (p. 33 ff.) unsere Kenntnis der harnstoffspaltenden Bakterien durch Isolierung einiger bis dahin unbekannter, durch genauere Beschreibung schon bekannter Formen; er wies außerdem auf die leichte Isolierungsmöglichkeit dieser Organismen durch Anwendung der „Anhäufungsmethode" hin. Löhnis (1905, p. 719; 1908, p. 684)

isolierte aus Dünger eine große Anzahl von Stämmen zum Teil, seiner Angabe nach, schon bekannter sporenbildender, wie nicht sporenbildender Arten und beschrieb sie ausführlicher.

Söhngen (1909, p. 91) untersuchte die Harnstoffspaltung bei Abwesenheit von Eiweiß und entdeckte zwei unter diesen Verhältnissen arbeitende, nicht sporenbildende Formen.

Christensen (1910, p. 336) verfolgte den Einfluß der Humusstoffe auf die Harnstoffspaltung. Er entdeckte einige Formen, die die Fähigkeit besaßen, Humusstoffe auszunutzen; außerdem züchtete Christensen einen kleinen, nicht sporenbildenden Organismus, der mit Harnstoff als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle auskommen konnte.

Rochaix und Dufourt (1910, p. 312; 1911, p. 205—207) haben aus Pferdemist mehrere harnstoffspaltende, kokken-und stäbchenförmige Bakterien isoliert, bei der Beschreibung jedoch fast nur biochemische Eigenschaften berücksichtigt. Auch Liebert isolierte aus Gartenerde einen nichtsporenbildenden Bazillus mit schwach harnstoffspaltender Wirkung (s. Liebert 1909, p. 61).

Der Vollständigkeit halber erwähne ich, daß sich außer den genannten Forschern auch Cohn (1872), Cazeneuve und Livon (1877), von Jaksch (1881), Warington (1888), Burchard (1899), Rovsing (nach Migula, 1900), Mann (nach Lehmann und Neumann, 1907 und 1912) und andere (siehe Kap. 10) mit dem Studium der ammoniakalischen Harn- oder Harnstoffzersetzung durch Bakterien beschäftigt haben.

Vorkommen und Verbreitung der harnstoffspaltenden Bakterien.

Bakterien mit Harnstoffspaltungsvermögen finden sich überall in der Natur vor: Nach den Untersuchungen der genannten Forscher, besonders denjenigen von Miquel (1904, p. 74) sind sie in Luft, Fluß, Kanal- und Abwässern, sowie auch in Erde anzutreffen. Kellner (1886) fand Harnstoffbakterien im Erdboden bis zu 1,20 m Tiefe; ihre lebhafteste Tätigkeit entfalteten sie allerdings nur 5 cm unterhalb der Erdoberfläche.

Gewinnung und Reinzucht.

Miquel (1904, p. 73) empfiehlt zur Gewinnung der Harnstoffbakterien die Keime des zu untersuchenden Materiales auf 2—5-proz. harnstoff- und peptonhaltigen Gelatineplatten zu züchten: die Kolonien harnstoffspaltender Bakterien umgeben sich dann mit einem weißen pulverförmigen Kranz von Calciumkarbonat und Calciumphosphatkristallen, die durch das im Nährboden entstehende Ammoniak ausgefällt werden.

Einfacher ist das Beijerincksche Anhäufungsverfahren (Beijerinck 1901): Man bringt das keimverdächtige Material, z. B. Erde, in 5- oder 10-proz. Harnstoffbouillon; nur die harnstoffspaltenden Organismen kommen zu einer kräftigen Entwicklung und bleiben schließlich allein in den Kulturen übrig, aus denen sie dann in Nährmedien mit geringerem Harnstoffgehalt übertragen werden. Sporenbildende Harnstoffspalter werden durch Pasteurisieren des Ausgangsmaterials, Kokken und Sarzinen durch Kultivierung bei niederen Temperaturgraden angehäuft.

Zur Reinzucht und weiteren Kultivierung wurden in den meisten Fällen Nährböden mit 2 Proz. Harnstoff benutzt.

Fangen und Reinzüchtung des Bac. probatus (Originalstamm).

Aus dem botanischen Garten zu Marburg a. L. wurde etwas Erde etwa 30 cm tief dem Boden entnommen, und eine kleine Menge davon nach kurzem Erhitzen bei 100° C mit stickstoffreier M-Nährlösung (siehe p. 6) angesetzt, die noch 2 Proz. Harnstoff und 0,5 Proz. Fleischextrakt enthielt. Nach dreiwöchiger Kultur bei 28° C entnahm ich der stark getrübten Flüssigkeit, die vorwiegend etwa 1 μ große Sporen und bis etwa 10 μ lange Stäbchen enthielt, eine geringe Menge, kochte sie 1 Minute bei 100° C ab und züchtete den sporenbildenden Bacillus nach der Kochschen Verdünnungsmethode rein. Als Kulturboden verwendete ich, da sich D-Agar als ungeeignet erwies, zuerst Harnstoffmineralagar, d. h. einen Agar, der die Nährstoffkonzentration oben genannter Nährlösung hatte (s. p. 6).

Auswahl des Nährbodens.

Die Versuche wurden angestellt, um einen Nährboden zu finden, auf dem sowohl das Wachstum, als auch die Sporenbildung gut und gleichmäßig vor sich ging.

Zu diesem Zwecke wurden folgende Nährböden hergestellt:

1. D-Agar neutral = Nähragar mit Dextrose (Pepton Witte 6,0, Fleischextrakt Liebig 4,0, Kochsalz 1,0, Dextrose 5,0, Agar-Agar 10,0, Wasser 500,0).
2. D-Agar neutral + 0,25 % Natriumkarbonat.
3. „ „ + 1,0 % Calciumkarbonat.
4. „ „ + 2 % Harnstoff + 0,3 % Ammoniumkarbonat.
5. Nähragar neutral (ohne Dextrose) + 0,25 % Natriumkarbonat.
6. „ „ + 3 % Harnstoff + 0,3 % Ammoniumkarbonat.
7. ⅓ D-Agar (= Agar mit ⅓ Nährstoffkonzentration) + 0,1 % Na_2CO_3.
8. $^1/_5$ „ „ „ $^1/_5$ „ + 0,1 % „
9. $^1/_{10}$ „ „ „ $^1/_{10}$ „ + 0,1 % „
10. ⅓ D-Agar + 0,05 % Natriumkarbonat.
11. ⅓ „ + 0,25 % „
12. ⅓ „ + 1,0 % „
13. ⅓ „ + 2 % Harnstoff + 0,1 % Natriumkarbonat.
14. ⅓ „ + 0,2 % „ + 0,1 % „
15. ⅓ „ + 0,2 % Ammoniumkarbonat + 0,1 % Natriumkarbonat.
16. Harnstoff-Mineral-Agar:
    2 % Harnstoff, 0,5 % Fleischextrakt Liebig, 100,0 M-Nährlösung (K_2HPO_4 0,1, $CaCl_2$ 0,01, $MgSO_4$ 0,03, NaCl 0,01, FeCl 0,001, H_2O 100,0).

Versuchsanordnung: Die Nährböden wurden zu etwa je 5 ccm in Reagensgläser gefüllt und sterilisiert. Als Impfmaterial fanden ausgereifte Sporen und junge Stäbchen von auf Harnstoffmineralagar gewachsenen Kulturen Verwendung. Die Kulturen wurden bei 28° gezüchtet.

Resultat der Kulturversuche:

Entwicklung	Sporenbildung	Nährboden
keine	keine	auf D-Agar lackmus neutral
schwache, unsichere	ganz vereinzelt	„ „ + 0,25 % Na_2CO_3
„ „	„ „	„ „ + 1 % $CaCO_3$
„ „	„ „	„ Nähragar + 0,25 % Na_2CO_3
„ „	„ „	„ ⅓ D-Agar + 1 % Na_2CO_3
„ „	„ „	„ D-Agar + 2 % Harnstoff + 0,3 % Ammonkarbonat.
deutliche	deutliche	„ ⅓ D-Agar + 0,1 % Na_2CO_3
„	„	„ $^1/_5$ „ + 0,1 % „
„	„	„ $^1/_{10}$ „ + 0,1 % „
„	„	„ ⅓ „ + 0,05 % „
„	„	„ ⅓ „ + 0,25 % „
„	„	„ Nähragar + 2 % Harnstoff + 0,3 % Ammonkarbonat.
gute	gute	„ ⅓ D-Agar + 0,1 % $NaCO_3$ + 0,3% Ammonkarbonat.
„	„	„ ⅓ D-Agar + 0,1 % Na_2CO_3 + 0,2 % Harnstoff.
„	„	„ ⅓ D-Agar + 0,1 % Na_2CO_3 + 2 % Harnstoff.
„	„	„ Harnstoff-Mineral-Agar.

1. Es geht aus den Versuchen hervor, daß erst ein Zusatz von Alkali die Entwicklung und Sporenbildung ermöglicht, daß diese aber durch Zusatz größerer Mengen von Alkali (Na_2CO_3) wieder gehemmt werden (siehe auch die quantitativen Versuche);

2. daß geringe Mengen Dextrose den normalen Entwicklungsgang begünstigen, größere Mengen ihn dagegen wieder hemmen.

3. daß ein Zusatz von Ammonkarbonat oder Harnstoff nur bei bestimmter Zusammensetzung des Nährbodens, sowie auch nur in bestimmten Mengenverhältnissen (siehe die genauen quantitativen Versuche p. 9) das Wachstum und die Sporenbildung begünstigt.

Die Reaktion des Nährbodens.

Maxima und Optima der Zusätze von Säure und Alkali, Ammonkarbonat und Harnstoff.

Ich stellte ferner das Maximum des Alkali- und Säurezusatzes, sowie das Optimum der Reaktion für meinen Stamm fest.

Als Nährboden verwendete ich lackmusneutralen ⅓ D-Agar, dem bestimmte, aber wechselnde Mengen Säure oder Alkali zugesetzt wurden; der fertige Nährboden wurde dann zu je 5 ccm in alkalifreie Jenaer Reagensröhren gefüllt und mit abgekochten (¼ Minute bei 100°) Sporen einer ausgereiften, normal vorbehandelten Kultur geimpft.

1. ⅓ D-Agar (lackmusneutral). Versuchstemperatur 28°.

Erst am 5. Tage nach der Impfung wurde eine schwache Trübung des Kondenswassers beobachtet. Nach 14 Tagen war ein dünner, kaum sichtbarer Belag an den Stellen, die das Kondenswasser berührt hatte, zu bemerken; mikroskopisch waren Stäbchen vorhanden, die Neigung zur Fadenbildung zeigten, Sporen wurden nur ganz vereinzelt beobachtet.

2. ⅓ D-Agar (lackmusneutral). +1 Tropfen n. H_2SO_4.

Tabelle I a.

Nährboden = ⅓ D-Agar + Natr. carbon. sicc.	Belag	Oidien	Sporen
1 Tropfen der Mol-Lsg. = 0,106 %	deutlich, dünn, häutig	ziemlich viel, meist normal	viel
2 „ „ „ = 0,212 %	sehr deutlich, häutig	weniger, meist normal	sehr viel
4 „ „ „ = 0,424 %	deutlich, dünn, häutig	weniger, meist normal	viel
6 „ „ „ = 0,636 %	deutlich, dünn, häutig	viel, z. T. geschwächt	viel
8 „ „ „ = 0,848 %	schwach sichtbar	viel, z. T. geschwächt	nicht viel
10 „ „ „ = 1,06 %	vereinzelt Kolonien	viel, z. T. geschwächt	vereinzelt
12 „ „ „ = 1,272 %	ganz vereinzelt Kolonien	wenig, z. T. geschwächt	ganz vereinzelt
14 „ „ „ = 1,484 %	nicht gebildet	wenig, geschwächt	keine
16 „ „ „ = 1,696 %	„ „	sehr wenig, geschwächt	„
18 „ „ „ = 1,908 %	„ „	vereinzelt Keimstäbchen	„
20 „ „ „ = 2,12 %	„ „	ganz vereinzelt Keimstäbchen	„
40 „ „ „ = 4,24 %	„ „	keine Keimstäbchen	„
60 „ „ „ = 6,36 %	„ „	keine Keimstäbchen	„

Tabelle I b.

Nährboden = ⅓ D-Agar + Ammon. carbon.	Belag	Oidien	Sporen
1 Tropfen der Mol-Lsg. = 0,157 %	sehr deutlich, dick, normal	wenig, normal	viel
2 „ „ „ = 0,314 %	sehr deutlich, dick, normal	sehr wenig, normal	sehr viel
4 „ „ „ = 0,628 %	sehr deutlich, dick, normal	wenig, normal	viel
6 „ „ „ = 0,942 %	sehr deutlich, dick	„ „	„
8 „ „ „ = 1,256 %	deutlich, dick	„ „	„
10 „ „ „ = 1,57 %	deutlich	mehr, normal	weniger
12 „ „ „ = 1,884 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
14 „ „ „ = 2,298 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
16 „ „ „ = 2,512 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
18 „ „ „ = 2,826 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
20 „ „ „ = 3,14 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
40 „ „ „ = 6,28 %	vereinzelt Kolonien	wenig, geschwächt	vereinzelt
60 „ „ „ = 9,42 %	ganz vereinzelt Kolonien	sehr wenig, geschwächt	keine
12,56 %	nicht gebildet	Keimstäbchen	„
15,7 %	„ „	vereinzelt Keimstäbchen	„
18,84 %	„ „	vereinzelt Keimstäbchen	„
21,98 %	„ „	ganz vereinzelt Keimstäbchen	„
25,12 %	„ „	keine Keimstäbchen	„

Nach 14tägigem Stehen bei 28° war nur mit der Lupe ein ganz dünner, häutiger Belag an den Stellen, die das Kondenswasser berührt hatte, zu bemerken. Mikroskopisch waren nur vereinzelte, geschwächte Stäbchen ohne Sporen vorhanden.

3. ⅓ D-Agar (lackmusneutral). + 2 Tropfen n. H_2SO_4.

Selbst nach wochenlangem Stehen bei 28° wurde kein Belag gebildet; mikroskopisch waren nur ganz vereinzelte Stäbchen vorhanden, die den Eindruck starker Schwächung machten.

Das Maximum des Säurezusatzes liegt also bei 2 Tropfen Normal-Schwefelsäure.

Um das Maximum des Alkalizusatzes und zugleich auch das Optimum des Alkalizusatzes zu bestimmen, wurden, wie aus den Tabellen zu ersehen ist, viele Versuche mit verschiedenen Mengen von Natriumkarbonat gemacht. Die gleichen Versuche wurden mit Ammonkarbonat und Harnstoff angestellt.

1. Das Natriumkarbonat wurde im Trockenschrank völlig entwässert, das Molekulargewicht beträgt dann 106. Diese Lösung wurde nun tropfenweise (siehe die Tabelle) dem lackmusneutralen Nährboden zugesetzt.

Das Maximum des Zusatzes von wasserfreiem Natriumkarbonat liegt bei etwas über 2 Proz., das Optimum etwa bei 0,2 Proz.

Tabelle I c.

Nährboden = ⅓ D-Agar +		Belag	Oidien	Sporen
0,2 %	Harnstoff	deutlich sichtbar, ziemlich dick, häutig	viel, normal	viel
2,0 %	„	deutlich sichtbar, dünn häutig	viel, z. T. normal, z. T. dünn	„
3,0 %	„	deutlich sichtbar, dünn häutig	viel, z. T. normal, z. T. dünn	weniger
5,0 %	„	deutlich sichtbar, dünn, häutig	viel, z. T. normal, z. T. dünn	„
6,0 %	„	deutlich sichtbar, dünn, häutig	viel, z. T. normal, z. T. dünn	„
9,0 %	„	sichtbar, dünn, häutig	viel, dünn, vakuolenreich	vereinzelt
10,0 %	„	„ „ „	„ „ „	„
12,0 %	„	kaum sichtbar, dünn, häutig	weniger, dünn, vakuolenreich	keine
15,0 %	„	kaum sichtbar, ganz dünn	weniger, dünn, vakuolenreich	„
18,0 %	„	kaum sichtbar, ganz dünn	weniger, dünn, vakuolenreich	„
21,0 %	„	nicht vorhanden	vereinzelt dünn, geschwächt	„
24,0 %	„	„ „	ganz vereinzelt Keimstäbchen	„
30,0 %	„	„ „	ganz vereinzelt Keimstäbchen	„
40,0 %	„	„ „	?	„

2. Als Ammoniumkarbonat wurde das anderthalbfach kohlensaure Ammonium des Handels, bestehend aus Ammoniumhydrokarbonat und Ammoniumkarbaminat ($NH_4 HCO_3 + NH_4 NH_2 CO_3 = 79 + 78$). verwendet Von diesem Salz wurde in dem Lösungsverhältnis 157 : 1000 4,71 g in 30 ccm Wasser gelöst und tropfenweise (siehe die Tabelle) dem lackmusneutralen Nährboden zugesetzt; die größeren Mengen wurden jedoch in Substanz dem flüssigen Agar zugesetzt und darin gelöst.

Das Maximum des Zusatzes von anderthalbfachem kohlensauren Ammonium liegt zwischen 22 und 25 Proz., das Optimum etwa bei 0,3 Proz.

3. Der Harnstoff ($NH_2 CO NH_2 = 60$) wurde meist in Substanz dem Nährboden zugesetzt.

Das Maximum des Zusatzes von Harnstoff liegt (siehe die Tabelle) **zwischen 30—40 Proz. Das Optimum des Zusatzes liegt unter 3 Proz. Harnstoff.**

Allgemeine Vorbehandlung zur Erzielung einheitlicher Kulturen.

Der im Marburger Institut befolgten Methode entsprechend, die isolierten Bakterien vor der Beschreibung mindestens 4 Wochen lang auf D-Agar zu züchten zur Erzielung einheitlicher, eventuell auch leichter vergleichbarer Kulturen, versuchte ich, das Wachstum der von mir isolierten Form dadurch zu erreichen, daß ich abgekochtes Sporenmaterial einer reifen, auf Harnstoffmineralagar (p. 6) gewachsenen Kultur als Impfmaterial auf D-Agar benutzte.

Das Wachstum auf D-Agar war aber — selbst wenn von nicht abgekochtem Sporenmaterial oder von kräftigen Oidien ausgegangen worden war — zumeist ein recht kümmerliches, oft trat auch gar kein Wachstum

ein; ein andermal trat dagegen Wachstum und selbst Sporenbildung ein. Es gelang mir jedoch nicht — trotz vieler dahin zielender Versuche — eine Anpassung des Bacillus probatus an D-Agar zu erreichen, auch dann nicht, als der Nährboden mit Natriumkarbonat oder Kalziumkarbonat versetzt worden war. Es wurden dann weiter Versuche mit $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$ D-Agar und Peptonagar gemacht: Ein Wachstum trat wohl auf allen diesen, mit 0,1 Proz. Natriumkarbonat alkalisch gemachten Nährböden ein, aber die Entwicklung verlief doch nicht mit der gewünschten Regelmäßigkeit. Ausschlaggebend für das Verlassen dieser Nährböden war das kümmerliche und unsichere Wachstum des Beijerinckschen Originalstammes, wie besonders der mir von Herrn Prof. Löhnis freundlicherweise übermittelten harnstoffspaltenden Stämme; diese waren, wie mir brieflich mitgeteilt wurde, durch ungünstige Umstände stark geschwächt, ihr Sporenbildungsvermögen degeneriert.

Meine Versuche mit $\frac{1}{3}$ D-Agar, dem außer 0,1 Proz. Natriumkarbonat noch 0,2 Proz. Ammonkarbonat zugesetzt waren, führten schließlich zu einem Erfolge: Das Wachstum und die Sporenbildung waren auf diesem Nährboden durchweg gut; von größter Bedeutung war es auch für die später zu besprechenden vergleichenden Versuche mit den mir übermittelten Kulturen anderer Harnstoffspalter, daß auf diesem Nährboden, obgleich er harnstofffrei war, doch ein Wachstum aller von mir kultivierten Formen eintrat. Der Nährboden, den ich künftig kurz nur Ammon-Agar nennen werde, wurde, um eine Verdunstung des Ammonkarbonats zu vermeiden, in kleinen Rex-Konservenflaschen (bez. v. Rex-Gesellschaft, Homburg v. d. H.) sterilisiert.

Durch Abkochen des Bakterienmaterials der mir übermittelten, zum Teil stark geschwächten Stämme trat weitere Schwächung ein; ich versuchte daher mit Überimpfung des Oidienmaterials auszukommen. Es gelang mir nun durch sehr oftes, fast tägliches Überimpfen von kräftig schwärmendem Oidienmateriale, die geschwächten Stämme zu beleben und ihr Sporenbildungsvermögen anzuregen. Mein Originalstamm verhielt sich selbst nach 8 Monate langer Behandlung in der angedeuteten Richtung völlig konstant, in keiner der nahezu 200 Kulturgenerationen war eine Schwächung eingetreten, die Stäbchen waren normal und bildeten auch normale Sporen aus.

Als Vergleichsnährböden wurden ferner noch hergestellt und in oben angegebener Weise sterilisiert:

$\frac{1}{3}$ D-Agar + 0,1 Proz. Natriumkarbonat + 0,2 Proz. Harnstoff und $\frac{1}{3}$ D-Agar + 0,1 Proz. Natriumkarbonat + 2 Proz. Harnstoff. Auch auf diesen Nährböden zeigten bei meist täglicher Überimpfung mein Stamm wie die anderen Stämme und Arten Wachstum und Sporenbildung.

Auf den genannten drei Nährböden wurden nun die weiter unten beschriebenen Stämme und Spezies vor der genaueren beschreibenden und vergleichenden Untersuchung mindestens 4 Wochen in der angegebenen Weise bei der Versuchstemperatur von 28° kultiviert.

Dieses Kulturverfahren bezeichne ich als allgemeine oder normale Vorbehandlung: es ist also in unserem Falle unter allgemein vorbehandeltem Bakterienmaterial ein solches zu verstehen, das auf einem näher bezeichneten Nährboden erhalten wurde durch mindestens 3—4 Wochen lange Kultur bei 28° und durch nahezu tägliches Überimpfen nicht abgekochter Zellen 1—2 Tage alter Kulturen.

Einfluß der Nichtabkochung des Bakterienmaterials vor der Umimpfung auf die Entwicklung und das Sporenbildungsvermögen.

Nach den Angaben in der Literatur wurde bei dem Überimpfen nicht abgekochten Bakterienmaterials meist eine Schwächung oder ein Verlust des Sporenbildungsvermögens beobachtet.

Nach Lehmann (1887) verloren die lange auf Gelatine gezüchteten Milzbrandbakterien die Fähigkeit, Sporen zu bilden; während die Virulenz ungeschwächt war, konnte selbst durch 10 Tierpassagen keine Sporenbildung mehr erzielt werden.

Beijerinck (1901. p. 45) sagt: „Bei wiederholtem Überimpfen geht das Vermögen zur exzessiven Sporenbildung verloren. Dieses beruht darauf, daß man ohne bestimmte Fürsorge, stets mehr vegetative Stäbchen wie Sporen überimpft, und viele dieser Stäbchen das Vermögen zur Sporenbildung vollständig verloren. Wird das übergeimpfte Material zuvor pasteurisiert, so daß nur Sporen zur Aussaat kommen, so bleibt die Sporenbildung und deshalb die übergeimpfte Kultur völlig konstant".

Bredemann (1909. p. 25) sagt hierzu: „Was die Abkochung der Sporen vor jedem Umimpfen anbelangt, so wurde dieselbe, ebenso wie von Gottheil (1901) und Neide (1904) auch von mir stets angewandt. Die geringe Benachteiligung, die, wie Garbowski (1907) auch für Bac. tumescens und Bac. luteus zeigte, durch die Abkochung der Sporen hervorgebracht wird, hat mich nicht abgehalten, stets vor jeder Umimpfung ein Abkochen der Sporen vorzunehmen, weil der eventuelle geringe Nachteil dieser Methode gegenüber dem Vorteil, der darin liegt, daß sich zur Nichtsporenbildung neigende Varianten nicht erhalten werden, gar nicht in Betracht kommt. Es ist nicht zu bezweifeln, daß es nur der vor jeder Überimpfung stattgehabten Abkochung zuzuschreiben ist, daß sich in den untersuchten Stämmen der Entwicklungszyklus von Spore zu Spore immer in glatter Weise vollzog, und ist bei Nachprüfung dieser Resultate das größte Gewicht darauf zu legen, daß dies Abkochen innegehalten wird, weil sonst die Stämme bald zurückgehen werden."

Kruse (1910. p. 137) schreibt: „Durch fortgesetzte, frühzeitige Übertragung der Bakterien auf neue Nährböden kann man die Sporulation dauernd unterdrücken."

Es geht hieraus hervor, daß bei Benutzung der gewöhnlichen Nährsubstrate durch die Abkochung des Materials einer Abnahme des Sporenbildungsvermögens bis zu gewissem Grade vorgebeugt werden kann. Etwas anders lauten die Ergebnisse Garbowskis.

Garbowski (1909; Diss. p. 5) sagt diesbezüglich folgendes: „Bei der Untersuchung der Entwicklung von Bac. luteus Smith et Baker ging ich nach den von Prof. Arth. Meyer und seinen Schülern ausgearbeiteten Methoden vor, mit dem einzigen Unterschied, daß ich die übliche „Abkochung" der Sporen (Gottheil 1901, Neide 1904) nicht anwendete, und zwar aus zwei Gründen: erstens fruktifizierten die von mir untersuchten Spezies auf einem geeigneten Nährmedium (⅓ D-Agar) so vollkommen, daß ich immer über für meine Zwecke genügend reines Sporenmaterial verfügte und zu keinen besonderen Mitteln zwecks Reinigung des Aussaatmaterials von vegetativen Formen Zuflucht zu nehmen brauchte, und zweitens weil ich mich überzeugte, daß der Entwicklungszyklus von Spore zu Spore bei

dem nicht abgekochten Material rascher und vollkommener sich in der ganzen Kultur abspielte, als bei dem auch nur ganz kurz abgekochten.

Garbowskis Erfahrung könnte damit zusammenhängen, daß die Sporen seiner Spezies ganz besonders empfindlich waren gegen das Abkochen.

Es wäre aber auch wohl denkbar, daß unter Umständen durch die stetige, verhältnismäßig lange Kultur auf einem durch die Exkrete der Bakterien verunreinigten Nährboden eine Schwächung selbst der Sporen eintreten könnte.

Das ist vielleicht bei meiner Spezies der Fall gewesen, denn es gelang mir nicht, geschwächte Kulturen auf günstigem Nährsubstrat zu besserer Sporenbildung zu bringen, wenn ich das sporenarme Material vor der Umimpfung abkochte und die Kulturen, von diesem abgekochten Sporenmateriale ausgehend, wieder bis zur Sporenbildung auf demselben Nährboden wachsen ließ.

Eigene Versuche mit der von mir benutzten Methode.

Wie ich schon im Abschnitte der „Allgemeinen Vorbehandlung" hervorgehoben habe, wurde junges, meist 24stündiges, kräftig schwärmendes Oidienmaterial fast täglich auf frische Kulturröhrchen von ⅓ D-Agar 1) mit 0,2 Proz. Ammonkarbonat, 2) mit 0,2 Proz. Harnstoff und 3) mit 2 Proz. Harnstoff übergeimpft. Die Nährböden enthielten je 0,1 Proz. Natriumkarbonat.

Es stellte sich bei diesen Versuchen, die außer mit meinem Stamm auch mit anderen Stämmen, ferner mit Sarcina ureae gemacht wurden, heraus, daß — im Einklang mit Garbowskis Beobachtungen und im Gegensatz zu den herrschenden Anschauungen (siehe oben) — das Sporenbildungsvermögen nicht geschwächt oder ganz unterdrückt, sondern gerade gestärkt wurde durch die häufige Übertragung kräftiger Zellen auf frische stoffwechselfreie Nährböden. Gleichzeitig beobachtete ich bei diesem Zuchtverfahren eine gleichmäßigere Ausbildung der Zellen bezüglich ihrer Gestalt und Größe und, in Bestätigung der Untersuchungen von Ellis (1901), auch eine wesentlich stärkere Schwärmfähigkeit.

Die Versuche waren unter optimalen Bedingungen vorgenommen worden, d. h. mit ganz jungem Materiale, das also so noch nicht durch die eigenen Stoffwechselprodukte geschwächt sein konnte und immer wieder auf günstige Nährböden übertragen und bei 28° C gezüchtet wurde.

Es ist mir also gelungen, das Sporenbildungsvermögen so wieder zu erhöhen; es zeigte sich auch, daß selbst nach monatelanger Kultur keine Schwächung des Sporenbildungsvermögens eintrat. Die Berücksichtigung optimaler Bedingungen möchte ich im Hinblick auf meine Resultate nochmals betonen; die abweichenden Resultate anderer Forscher hängen vielleicht damit zusammen, daß die von ihnen innegehaltenen Kulturbedingungen keine optimalen waren.

Einfluß der Strichüberimpfung bei nicht optimaler Temperatur auf Entwicklung und Sporenbildungsvermögen.

Verschiedene Autoren, Pasteur, Chamberland und Roux (1881), Chamberland und Roux (1883) und Roux (1890) haben früher beobachtet, daß Kulturen von Pest- und Milzbrandbazillen durch Züchtung bei 42° die Fähigkeit zur Sporenbildung verloren; ich untersuchte

daher nun den Einfluß der auch für Bac. probatus supraoptimalen Temperatur auf sein Sporenbildungsvermögen.

Es wurden täglich Strichüberimpfungen nicht abgekochten 24-stündigen Oidienmateriales vorgenommen und alle Kulturen bei 42° im Brutschrank aufbewahrt und nur zur Überimpfung herausgenommen. Durch die Kultur bei 42° trat eine deutliche Schwächung der Wachstumsfähigkeit und des Sporenbildungsvermögens ein; das Maximum der Sporenbildung liegt zwischen 42° und 43°. Die häufige Überimpfung bei 42° zeitigte nun aber eher eine Anpassung an die maximale Temperatur als eine Schwächung des Sporenbildungsvermögens.

Tabelle II a.

Überimpfung	Datum der Abimpfung	Versuchs-Temperatur	Versuchsmaterial: 25. Strichgeneration		
			Belag	Oidien	Sporen
1.	17. I.	17°	dick, schleimig	wenig	viel
2.	25. I.	„	„ „	„	„
3.	3. II.	„	dünn, häutig	viel	wenig
4.	6. III.	„	dick, schleimig	viel, Fäden	mehr
5.	14. III.	„	dünn, häutig	viel, dünn u. lang	„
6.	23. III.	„	„ „	„ „ „ „	„
7.	30. III.	„	„ „	„ „ „ „	„
8.	7. IV.	„	„ „	„ „ „ „	„
9.	15. IV.	„	„ „	„ „ „ „	„
10.	23. IV.	„	„ „	wenig, dünn und lang	„
11.	4. V.	„	„ „	sehr wenig, dünn und lang	vereinzelt
1.	17. I.	28°	dick, schleimig	wenig	sehr viel
2.	25. I.	„	„ „	„	„ „
3.	3. II.	„	„ „	„	„ „
4.	6. III.	„	„ „	„	„ „
5.	14. III.	„	„ „	sehr wenig	fast ausschließlich
6.	23. III.	„	„ „	„ „	„
7.	30. III.	„	„ „	„ „	„
8.	7. IV.	„	„ „	„ „	„
9.	15. IV.	„	„ „	„ „	„
10.	23. IV.	„	„ „	„ „	„
11.	4. V.	„	„ „	„ „	„
1.	17. I.	42°	deutlich, häutig	viel, z. T. dünn, z. T. Fäden	wenig
2.	25. I.	„	dünn, häutig	„	„
3.	3. II.	„	„ „	„	„
4.	6. III.	„	deutlich, schwach-schleimig	„	mehr
5.	14. III.	„	„	„	„
6.	23. III.	„	„	„	„
7.	30. III.	„	„	„	„
8.	7. IV.	„	dünn, häutig	wenig, z. T. dünn z. T. Fäden	wenig
9.	15. IV.	„	„ „	„	„
10.	23. IV.	„	„ „	„	„
11.	4. V.	„	„ „	sehr wenig, z. T. dünn, z. T. Fäden	vereinzelt

Tabelle II b.

Überimpfung	Datum der Abimpfung	Versuchs-Temperatur	Versuchsmaterial: 40. Strichgeneration		
			Belag	Oidien	Sporen
1.	17. I.	17°	dick, schleimig	wenig	viel
2.	25. I.	„	„ „	wenig Fäden	
3.	3. II.	„	dünn, häutig	viel, Fäden	wenig
4.	6. III.	„	„ „	viel, dünn u. lang	sehr wenig
5.	14. III.	„	„ „	„ „ „ „	„ „
6.	23. III.	„	deutlich, häutig	vorwiegend normale	mehr
7.	30. III.	„	„ „	„ „	viel
8.	7. IV.	„	deutlich, schleimig	„ „	„
9.	15. IV.	„	„ „	„ „	„
10.	23. IV.	„	„ „	wenig	„
11.	4. V.	„	„ „	wenig, z. T. Fäden	„
1.	17. I.	28°	dick, schleimig	sehr wenig	sehr viel
2.	25. I.	„	„ „	„ „	„ „
3.	3. II.	„	„ „	„ „	„ „
4.	6. III.	„	„ „	„ „	fast ausschließlich
5.	14. III.	„	„ „	„ „	„
6.	23. III.	„	„ „	„ „	„
7.	30. III.	„	„ „	„ „	„
8.	7. IV.	„	„ „	„ „	„
9.	15. IV.	„	„ „	„ „	„
10.	23. IV.	„	„ „	„ „	„
11.	4. V.	„	„ „	„ „	„
1.	17. I.	42°	deutlich, schwachschleimig	viel, z. T. geschwächt	nicht viel
2.	25. I.	„	„	„	„ „
3.	3. II.	„	„	„	„ „
4.	6. III.	„	„	weniger, meist normal	viel
5.	14. III.	„	„	„	„
6.	23. III.	„	„	„	„
7.	30. III.	„	„	„	„
8.	7. IV.	„	„	„	„
9.	15. IV.	„	„	„	„
10.	23. IV.	„	„	„	„
11.	4. V.	„	dünn, häutig	wenig, Kultur geschwächt (Austrocknung?)	nicht viel

Die bei 43° und 44° gezüchteten Kulturen zeigten weitgehende Schwächung des Wachstums, Sporen wurden bei diesen Temperaturen nicht mehr ausgebildet. Wurden diese Kulturen aber nachträglich bei 28° oder Zimmertemperatur hingestellt, so trat wieder, wenn auch ganz vereinzelt in den bei 44° C gezüchteten Kulturen, Sporenbildung ein, vorausgesetzt, daß der Nährboden nicht ganz ausgetrocknet war.

Es war also nicht möglich gewesen, durch Kultur bei maximalen Temperaturgraden und täglicher Überimpfung das Sporenbildungsvermögen zu unterdrücken; ja die geschwächten Kulturen erholten sich wieder, wenn sie nachträglich übergeimpft und unter optimalen Bedingungen weiter kultiviert wurden.

Tabelle II c.

Überimpfung	Datum der Abimpfung	Versuchs-Temperatur	Versuchsmaterial: 40. Strichgeneration. bei 100₀ abgekochtes Material		¼ min.
			Belag	Oidien	Sporen
1.	17. I.	17°	dick, schleimig	wenig	viel
2.	25. I.	„	„ „	„	„
3.	3. II.	„	dünn, häutig	viel	weniger
4.	6. III.	„	deutlich, häutig	wenig	mehr
5.	14. III.	„	deutlich, schleimig	„	viel
6.	23. III.	„	„ „	„	„
7.	30. III.	„	„ „	„	„
8.	7. IV.	„	dick, schleimig	„	„
9.	15. IV.	„	„ „	„	„
10.	23. IV.	„	„ „	„	„
11.	4. V.	„	„ „	wenig, z. T. Fäden	sehr viel
1.	17. I.	28°	dick, schleimig	wenig	sehr viel
2.	25. I.	„	„ „	„	„ „
3.	3. II.	„	„ „	„	„
4.	6. III.	„	„ „	sehr wenig	fast ausschließlich
5.	14. III.	„	„ „	„ „	„
6.	23. III.	„	„ „	„ „	„
7.	30. III.	„	„ „	„ „	„
8.	7. IV.	„	„ „	„ „	„
9.	15. IV.	„	„ „	„ „	„
10.	23. IV.	„	„ „	„ „	„
11.	4. V.	„	„ „	„ „	„
1.	17. I.	42°	deutlich, schwachschleimig	viel, z. T. dünn	nicht viel
2.	25. I.	„	„	„ „ „ „	„ „
3.	3. II.	„	„	„ „ „ „	„ „
4.	6. III.	„	„	„ „ „ „ Fäden	wenig
5.	14. III.	„	„	viel	mehr
6.	23. III.	„	„	weniger, meist normal	„
7.	30. III.	„	„	„	„
8.	7. IV.	„	„	„	„
9.	15. IV.	„	„	„	viel
10.	23. IV.	„	„	„	„
11.	4. V.	„	dünn, häutig	wenig, geschwächte Kultur	nicht viel

Dasselbe Resultat zeitigten Versuche, die unter sonst gleichen Bedingungen auf Ammon-Agar bei durchschnittlich 17° gemacht wurden. (Die Temperatur schwankte von 13—19°.)

Es schien nun angebracht, den Einfluß der „Strichüberimpfung“ bei den Temperaturen 17°, 28° und 42° zu verfolgen, wenn das Impfmaterial nicht täglich, sondern nur alle 8 Tage oder gar in einem Zwischenraum von 4 Wochen übergeimpft wurde, also durch die eigenen Stoffwechselprodukte geschwächt sein konnte. Diese Versuche, die nahezu 4 Monate lang fortgesetzt wurden, hatten das Ergebnis, daß auch hier in keinem Falle eine Unterdrückung des Sporenbildungsvermögens beobachtet werden konnte; die Kulturen waren allerdings nicht ganz so kräftig und enthielten nicht so viel

Tabelle II d.

Überimpfung	Datum der Überimpfg.	Versuchs-Temperatur	Versuchsmaterial: 30. Strichgeneration auf Ammon-Agar		
			Belag	Oidien	Sporen
1.	8. XII.	17°	deutlich, schleimhäutig	viel, z. T. fädig	nicht viel
2.	16. XII.	„	„	„ „ „ „	„ „
3.	22. XII.	„	„	„ „ „ „	„ „
4.	4. I.	28°	„	„ „ „ „	ziemlich viel
5.	5. I.	„	dick schleimhäutig	nicht viel, normal	„
6.	6. I.	„	dick, schleimig	„ „ „	viel
7.	7. I.	„	„ „	„ „ „	„
8.	8. I.	„	„ „	„ „ „	„
9.	9. I.	„	„ „	„ „ „	„
10.	11. I.	„	„ „	„ „ „	„
1.	8. XII.	42°	deutlich, schleimhäutig	viel z. T. fädig	wenig
2.	16. XII.	„	„	viel, z. T. dünn und fädig	„
3.	22. XII.	„	„	„	„
4.	4. I.	28°	„	viel, vorwiegend normal	ziemlich viel
5.	5. I.	„	dick, schleimhäutig	wenig ,vorwiegend normal	„
6.	6. I.	„	deutlich, schleimig	„	„
7.	7. I.	„	dick, schleimig	„	„
8.	8. I.	„	„ „	„	sehr viel
9.	9. I.	„	„ „	sehr wenig,	fast ausschließlich
10.	1.1 I.	„	„ „	sehr wenig, normal „ „ „	„
1.	3. I.	17°	dünn, häutig	viel, z. T. dünn, fädig	vereinzelt
2.	4. I.	„	„ „	„	„
3.	5. I.	„	deutlich, häutig	„	mehr
4.	6. I.	„	„ „	viel, vorwiegend normal	„
5.	7. I.	„	„ „	„	„
6.	8. I.	„	„ „	„	„
7.	9. I.	„	„ „	„	„
8.	10. I.	„	„ „	„	„
9.	11. I.	„	„ „	„	„
10.	12. I.	„	„ „	„	„
1.	4. VI.	43°	ganz dünn, hauchartig	nicht viel, dünn, geschwächt	keine
2.	5. VI.	„	„	„	„
3.	6. VI.	„	„	„	„
4.	7. VI.	„	„	„	„
5.	8. VI.	„	„	„	„

Sporen, als die unter gleichen Temperaturverhältnissen gezüchteten, aber täglich übergeimpften; am deutlichsten war noch die geringe Schwächung der Kulturen, die aus dem 4 Wochen nicht übergeimpften Materiale erwachsen waren.

Zu berücksichtigen ist bei den Resultaten auch noch der schädigende

Einfluß der Austrocknung bei Kulturen, die nicht abgeschlossen und wie hier z. T. noch höheren Temperaturgraden ausgesetzt wurden.

Ganz im allgemeinen läßt sich wiederholenderweise, wenigstens für die von mir untersuchten Stämme, aussagen, daß das Sporenbildungsvermögen allein durch Strichüberimpfung nicht abgekochten Materials keineswegs unterdrückt wird.

Eine Schwächung kann eintreten, ist dann aber wohl die Folge einer allgemeinen Schwächung der Zellen. Ist diese nicht zu weit fortgeschritten, so läßt sich durch Kultur bei optimalen Bedingungen wieder eine Kräftigung der Zellen und damit auch wieder die Ausbildung von Sporen hervorrufen.

Einfluß von Giften, Säuren und Alkalien auf das Sporenbildungsvermögen.

Wir werden später (p. 58 ff.) bei der Besprechung der Widerstandsfähigkeit von Sporen und Oidien gegen Giftlösungen sehen, daß auch durch Giftzusatz zum Nährboden eine dauernde Asporogenität meines Originalstammes nicht zu erzielen war, ebensowenig vermochten Säuren (p. 57) oder Alkalien (p. 7 ff.) das Sporenbildungsvermögen dauernd zu unterdrücken.

Einfluß von Alkali auf die Sporenbildung.

Über den Einfluß von Alkali auf die Sporenbildung liegen mehrere Angaben vor (Literatur bei Pringsheim 1910. p. 157 und bei Garbowski, p. 21 der Diss. 1907). Behring erwähnt (1889, 1890), daß es ihm gelungen sei, durch Zusatz von 0,12 Proz. NaOH zum Nährboden asporogene Rassen vom Milzbrandbacillus zu züchten. Garbowski (1907) setzte seinem Kulturnährboden: Fleischextrakt-Peptonagar wechselnde Mengen Sodalösung zu und impfte ihn mit Bacillus luteus. Das zugesetzte Natriumkarbonat beeinträchtigte zwar die Sporenbildung, beeinflußte aber auch die vegetative Entwicklung, so daß es nicht gelang, lebensfähige Kulturen heranzuzüchten, die völlig sporenfrei waren; eine asporogene Rasse hat er also durch Zusatz von Alkali zum Nährboden nicht erhalten können.

Aus der beigegebenen Tabelle (Tabelle No. II a—d) ist diese Abhängigkeit der Sporenbildung von der Entwicklung der Zellen deutlich zu ersehen.

Nach den von uns gemachten Erfahrungen ist das Sporenbildungsvermögen das am leichtesten zu schwächende; es war jedoch nicht möglich, Verhältnisse zu schaffen, bei denen zwar die dauernde normale Entwicklungsfähigkeit der Zellen erhalten blieb, aber das Sporenbildungsvermögen völlig und dauernd unterdrückt wurde.

Kapitel 2.

Allgemeine morphologische Eigenschaften.

Normale Wuchsformen der Morphoden.

Endosporen. — Größenmessungen.

Form. Die kugelige Gestalt herrscht vor; es wurden jedoch auch elliptische, eiförmige und zylindrisch-walzenförmige Sporen beobachtet (Fig. 1—3).

Größe. Größenmessungen im allgemeinen. Die Größenmessungen der verschiedenen Morphoden und Geißeln wurden in allen Fällen in der

von Prof. Meyer (1903. p. 69) angegebenen und wie folgt abgeänderten Weise vorgenommen: Mit dem Zeichenapparat wurde das gerade 2400-fach vergrößerte Objekt — stets in Wasser liegend — aufgezeichnet und bei den Zeichnungen möglichst ein ganzes Gesichtsfeld berücksichtigt. Um gute Durchschnittswerte und möglichst alle in der Kultur ausgebildeten Zellgrößen in das mikroskopische Präparat zu bekommen, wurde der Bakterienrasen von dem Kulturboden mit sterilem Wasser in ein kleines Gläschen geschwemmt, gemischt und von dieser Mischung, schwach milchig getrübt, ein kleines Tröpfchen auf den Objektträger übertragen.

Um die Sporen, die manchmal lebhafte Molekularbewegung zeigen, zur Ruhe zu bringen, wurde dafür gesorgt, daß sich eine möglichst dünne Flüssigkeitsschicht zwischen Objektträger und Deckglas befand, ferner daß größere Luftblasen im Präparate vorhanden waren; man kann auch das mikroskopische Präparat mit einem Wachsrande zuschließen, muß aber dann gewöhnlich längere Zeit bis zum völligen Absetzen der Sporen warten. Ein Zusatz von Farblösung oder von Säure beschleunigt bekanntermaßen das Absetzen der Zellen und erleichtert das Zeichnen, ist aber aus folgenden Gründen, selbst vorausgesetzt, daß man den Zusatz ausdrücklich betont, im allgemeinen nicht zu empfehlen: Durch den Zusatz von Farblösungen oder von Säuren wird die Größe der Zellen verändert, entweder quillt oder schrumpft sie und zwar, da der Zusatz dieser Mittel nie gleich stark bemessen werden kann, verschieden stark.

Je größer nun die Anzahl der gezeichneten Zellen, desto größer natürlich auch die Genauigkeit des Resultates; zur Festlegung der Variationskurve, z. B. für Sporen, wurden meist 100 Stück gezeichnet. Zum Zeichnen stellt man den Rand der betr. Zelle scharf ein, das Plasma erscheint dann weniger stark lichtbrechend, zieht mit einem sehr spitzen Bleistift (Kohinur, Härte etwa 4—5 H.) die Randkonturen genau nach und überzeugt sich, daß sich die Konturen der Zeichnung mit denen der Zelle decken. Wo das Nachziehen der Konturen mit dem Bleistift Schwierigkeiten macht, z. B. bei sehr feinen Gebilden wie den Geißeln, empfiehlt es sich, gerade, gleichmäßig in ihrer Dicke etwas voneinander abweichende, der beobachteten Zellgröße aber annähernd entsprechende Bleistiftstriche zu machen und unter Zuhilfenahme des Zeichenprismas mit der Zelle durch Deckungsversuche direkt zu vergleichen.

Die Messungen werden dann mit einem auf Veranlassung von Herrn Prof. Meyer von der Firma Seibert in Wetzlar gelieferten Maßstabe vorgenommen.

Auf dem Maßstabe waren 20 μ in 2400-facher Vergrößerung = 4,8 cm, geteilt in 100 Grade, eingeritzt und durch Farbstoff geblaut worden; der Abstand eines Teilstriches vom anderen entsprach so 0,2 μ; der 5. Teilstrich war jedesmal nach oben und unten verlängert worden, um dadurch die ganzen μ-Grade besser hervorzuheben; von 5 zu 5 μ waren entsprechende Zahlen an den Strichen angebracht. Der Maßstab wurde zur Messung mit der eingeritzten Seite auf die Zeichnung gelegt und die Messung der gezeichneten Bakterien mit der Lupe vorgenommen; 0,1 μ und darunter lassen sich auf diese Weise noch recht gut messen oder abschätzen.

Da die Zusammensetzung des Nährbodens von großem Einfluß auf die Sporengröße sein kann, wurden Sporen gemessen, die auf verschiedenen Substraten gewachsen waren.

So betrug die Größe der Sporen, die

1. einer 2 Monate alten, auf Harnstoff-Mineralagar gezüchteten Kultur entnommen waren:

Kugelige Sporen — Variationsbreite 0,6—1,0 μ.
Längliche Sporen — vorwiegend 0,8 : 0,9 μ
Ihre Form war meist kugelig.
Ihre Größe betrug meist 0,9 μ.

2. einer 3 Wochen alten Kartoffel-Kreidekultur entstammten:

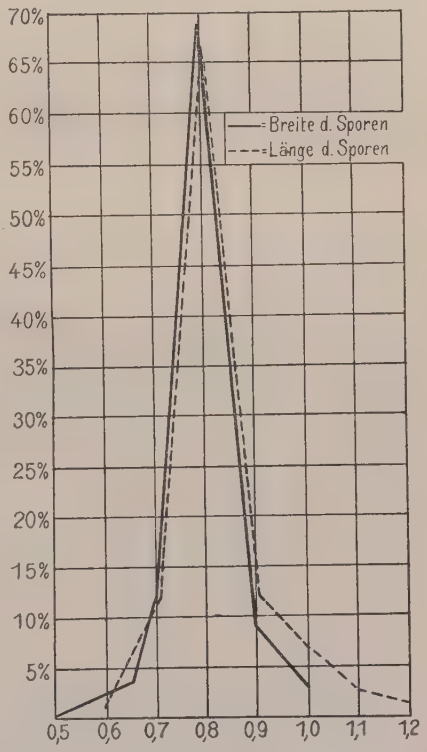
Kugelige Sporen — Variationsbreite 0,6—1,1 μ.
Längliche Sporen — einzelne 0,8 : 1.2, μ
Ihre Form war meist kugelig.
Ihre Größe betrug meist 0,9 μ.

3. auf Ammon-Agar gewachsen und 4 Wochen alt waren:

Kugelige Sporen — Variationsbreite 0,6—1,0 μ.
Längliche Sporen — vereinzelt, Breite 0,5, Länge 1,2 μ.
Die Durchschnittsform war kugelig.
Die Durchschnittsgröße war 0,8 μ.

Der Unterschied der Sporengrößen auf den genannten Kulturböden ist hier nicht so groß, weil diese keinen für das Wachstum und die Sporenbildung schädlichen Einfluß ausübten.

Variationskurve für Sporengröße auf Ammon-Agar.



Es wurden je 100 Sporen der 1., 30., 60. und 90. Kulturgeneration auf Ammon-Agar gemessen, im ganzen also 400 Sporen. Die Messungen ergaben:

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2 μ
Länge		6	47	269	36	27	10	5 Stück
Breite	2	15	48	275	48	12		,,

Die Größe der kugeligen Sporen wurde bei Aufstellung dieser Zahlen der Sporenlänge und Sporenbreite in gleicher Weise berücksichtigt, und zwar so, daß bei einer kugeligen Spore z. B. der Größe 0,9 μ sowohl die Länge, als auch die Breite mit 0,9 μ berechnet wurde.

Da die Sporen vorwiegend kugelig sind, so fällt auch die Kurvenspitze der Sporenbreite mit der der Länge annähernd zusammen.

1 Strichkultur auf Ammon-Agar.

Sporengröße länglicher Sporen:

Länge	0,8	1,0	1,0	1,1	1,2 μ
Breite	0,6	0,8	0,9	0,9	0,9 ,,
Stück	1	1	1	9	4

Sporengröße kugeliger Sporen:

Länge	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ
Stück	1	11	60	9	3

30 Strichkultur auf Ammon-Agar.

Sporengröße länglicher Sporen:

Länge	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0	1,2 μ
Breite	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9	1,0 ,,
Stück	3	1	2	6	1	1

kugeliger Sporen:

0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ	
1	7	66	8	3	

60 Strichkultur auf Ammon-Agar.

Sporengröße	länglicher Sporen:						kugeliger Sporen:				
Länge	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0	1,1 μ	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ
Breite	0,6	0,6	0,7	0,8	0,9	0,9 „					
Stück	1	2	1	4	1	1	1	10	68	8	3

90 Strichkultur auf Ammon-Agar.

Sporengröße	länglicher Sporen:					kugeliger Sporen:				
Länge	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0 μ	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ
Breite	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9 „					
Stück	2	2	2	1	1	3	16	67	5	2

Sporenmembran.

Die Membran der Sporen war ohne Färbung wegen der Kleinheit des Objektes nicht deutlich zu sehen; bei Färbung mit Methylenblaulösung (1 + 10) schien die Exine etwas dunkler blau gefärbt zu sein, als die Intine. Die Membran enthält Chitin.

Sporangienmembran.

Die Sporen waren in jungen Kulturen nur selten frei anzutreffen; freie Sporen wurden beobachtet in 14 Tage alter Ammon-Agarkultur und weiter z. B. in 8 Tage alter Kartoffelkultur; in 40 Tage alter Harnstoff-Mineralagarkultur und in 6 Monate alter Ammon-Agarkultur waren vorwiegend freie Sporen vorhanden.

Entweder haften kaum sichtbare Reste der Sporangienmembran an der Spore (Fig. 1) oder ein Teil des Sporangiums umgibt hüllenartig oder kapselartig die Spore (Fig. 2 u. 3).

Diese Erscheinung trat besonders im Laufe der künstlichen Kultivierung häufig auf, während sie im Anfange nur selten beobachtet worden war; ich komme auf diese Hüllen-Hemangienbildung noch näher zu sprechen.

Sporenkeimung.

Die Sporenkeimung erfolgte auf günstigen Nährböden meist nach 5—6, auf Ammon-Agar schon nach 5 Stunden. Freie längliche Sporen keimten vorwiegend äquatorial, zuweilen auch polar (Fig. 6, 52; 5, 8). Die Anschwellung der Sporen vor der Keimung war wohl zu beobachten, aber nicht sehr erheblich. Der Keimschlauch trat bei den in Sporangien eingeschlossenen Sporen entweder seitlich oder an der Basis aus; auch an der Spitze des Sporangiums wurde einmal eine Keimung beobachtet (Fig. 7). Es scheint so zu sein, daß die Spore an der wenigst oder gar nicht ausgebildeten Stelle der Sporangienmembran ihren Keimschlauch hindurchschiebt; die vor der Keimung freiwerdenden Sporen treten wohl auch an diesen Stellen aus der Sporangienhülle heraus (siehe auch das p. 22 Gesagte).

Keimstäbchen.

Eine Teilung des bei der Sporenkeimung heraustretenden, zum Teil noch in der Hülle befindlichen Keimstäbchens konnte nicht beobachtet werden (Fig. 8, 52). Die Stäbchen begannen sofort zu schwärmen; es gelang auch die Geißeln in meist geringer Anzahl und feiner Ausbildung sichtbar zu machen (Fig. 8, 52). Größe der Keimstäbchen auf Ammon-Agar: Breite 0,4—0,6 μ, Länge 2—4 μ, meist 3 μ.

Oidien.

Die aus den Keimstäbchen hervorgehenden Oidien sind in 15 Stunden alter, auf Ammon-Agarkultur bei 28° gewachsener Kultur reichlich anzutreffen.

Form. Ihre Form ist meist eine 1-stäbige bis 3-stäbige (Fig. 12—23); die Enden sind deutlich abgerundet. Die Stäbchen sind gewöhnlich annähernd 1 μ lang, es kommen aber auch 2—3 μ lange, ein- und mehrzellige Stäbchen vor und zwar wurden sie häufiger auf alkalischer Nährgelatine beobachtet (Fig. 18 u. 19).

Größe. Die Stäbchengröße schwankt sehr, je nach der Zusammensetzung des Nährbodens; ja sie schwankt sogar erheblich in ein und demselben Nährboden (Fig. 12—23).

So fand ich auf Ammon-Agar (2 Tage alte Kultur der 69. Generation) Oidien folgender Größe:

Breite 0,6—1,1 μ, vorwiegend 0,8 μ
Länge 2—22 μ, „ 2—4 μ,

auf Kartoffelscheiben, die mit 1 ccm einer 2-proz. Anschüttelung von $CaCO_3$ in H_2O getränkt waren, nach 2 Tagen:

Breite 0,6—1,1 μ, vorwiegend 0,9 μ
Länge 2—5 μ, „ 3 μ,

auf ⅓ D-Agar + 0,25 Proz. Na_2CO_3 + (3 Tage alte Kultur)

Breite 0,5—0,8 μ, vorwiegend 0,7 μ
Länge 2—5 μ, „ 3 μ,

auf ⅓ D-Agar + 1 Proz. Na_2CO_3

Breite 0,5—1 μ, vorwiegend 0,7 μ
Länge 2—10 μ, „ 3—5 μ,

auf Nährgelatine + 0,1 Proz. Na_2CO_3

Breite 0,8—1 μ, vorwiegend 0,8 μ
Länge 3—20 μ, „ 5—10 μ,

auf Harnstoffmineral-Agar

Breite 0,6—0,8 μ, vorwiegend 0,8 μ
Länge 2—4 μ, „ 3 μ,

auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff

Breite vorwiegend 0,4—0,6 μ
Länge „ 3—5 μ.

In Nährlösungen, wie z. B. den Nährlösungen 0, 1, 11, sowie in Bouillon trat bei ausreichender Alkalität dieser Nährmedien die Ausbildung normaler Oidien ein:

Breite 0,6—0,8 μ, vorwiegend 0,8 μ
Länge „ 3—4 μ.

Jedoch wurde in den flüssigen Nährböden häufiger Fadenbildung beobachtet, als in festen Nährmedien.

Die Fäden hatten meist eine Breite von 0,6 μ und eine recht verschiedene Länge; es wurden 20—40 μ lange Fäden und in Bouillon sogar ein 103 μ langer Faden gemessen.

Sporangien.

Am 3. Tage bilden sich, wenn man von Sporen ausgeht, in der bei 28° C gehaltenen Kultur von Ammon-Agar Sporenanlagen und zwar in der für Bac. asterosporus (A. Meyer, 1897) beschriebenen Weise.

Form. Die Stäbchen schwellen bei der Sporenbildung meist am Ende an, entweder bauchig, keulig, trommelschlägerförmig oder clostridienförmig (Fig. 24—33). Die Clostridien- und Trommelschlägerform herrscht vor. Der Sitz der Spore ist gewöhnlich dem einen Sporangienende genähert, es kommen aber auch Abweichungen vor, so daß man auch solche Sporangien finden

kann, bei denen die Spore in oder nahe der Mitte des sporangiumbildenden Stäbchens liegt (Fig. 25, 57).

Auf Ammon-Agar wurde auch einmal ein Sporangium mit 2 Sporen beobachtet.

Größe. Die Größe der Sporangien ist wie die der Oidien, aus denen sie ja entstehen, eine schwankende; so wurden 3—6 μ lange Sporangien beobachtet; zumeist waren sie 3—4 μ lang, weshalb diese Größe auch als die Normalsporangiengröße bezeichnet wird.

Die Sporangien sind zum Teil lebhaft beweglich, es gelang mir mit der Geißelfärbung Geißeln daran nachzuweisen (Fig. 33, 57).

Die Membran der Sporangien enthält Chitin.

Das Freiwerden der Sporen tritt auf Ammon-Agar zumeist erst nach 14 Tagen oder später ein.

Beim Freiwerden trat die Spore entweder aus dem Sporangium heraus, oder sie verblieb, was meistens der Fall war, im Sporangium, das sich in ganz eigenartiger Weise umgestaltete. Der untere, sporenfreie Teil des Sporangiums verschwand dabei ganz oder doch fast ganz (Fig. 34—39).

Eine ähnliche Erscheinung ist von mehreren Forschern bei dem Bac. amylobacter A. M. et Bredemann beobachtet worden. Der Arbeit von Bredemann (1909, p. 54—57), wo sich nähere Angaben finden, entnehme ich folgendes:

Winogradsky nahm an, daß die Sporenmutterzelle um die Spore herum vollständig mit einer hyalinen Schicht gefüllt sei, welche aufquelle, so die Membran der Mutterzelle an einem Pole sprenge und weit öffne. Die Spore lag in einem abgerundeten dreieckigen Gallertpolsterchen eingebettet, das an zwei Seiten scharfe und an der dritten, der Öffnung, verwaschene Konturen zeigte.

Kentner beobachtete das Abbrechen der sterilen Zellpartie. Bredemann und Haselhoff sahen ein allmähliches Auflösen des Inhaltes und der Membran des sporenfreien Sporangiumteiles.

Auch ich habe aus meinen Kulturen den Eindruck gewonnen, daß ein allmähliches Auflösen des Inhaltes und der Membran der unteren, sporenfreien Sporangienhälfte vor sich geht. Der Sporangienrest umgibt hüllen- oder kapselartig die Spore (Fig. 3, 34—39). Ich bezeichne diese besondere Ausbildung, d. h. die Erhaltung der einen Sporangienhälfte und kapselartige Umbildung, die — wie schon erwähnt — häufig in meinen Kulturen auftrat, auf Veranlassung von Herrn Prof. Meyer mit dem Namen „Hemangium" (Sporangienhälfte).

Form und Größe des Hemangiums sind verschieden (Fig. 34—39). Wie die Abbildungen (Fig. 38 u. 39) zeigen, gelang es mit der Geißelfärbung auch an den Hemangien Geißeln nachzuweisen.

Mit Methylenblaulösung (1 + 10) und Fuchsinlösung gefärbt, lassen sich keine Differenzierungen des Hemangiums erkennen. In der Wand ließ sich Chitin nachweisen.

Anormale Wuchsformen der Morphoden.

Schwell-Involutionsformen.

Es fanden sich in den verschiedenen Kulturen die merkwürdigsten Schwellformen, so z. B. blasig geschwollene, hefenähnliche, bauchige, kugelige und andere Umgestaltungen (Fig. 42—44). Besonders häufig traten solche Formen in Nährlösung 1 auf, die 2 Proz. Harnstoff enthielt.

Mikroidien.

Unter Mikroidien versteht man nach Prof. A. Meyer (siehe Garbowski 1907; Bredemann 1909, p. 60) kokkenähnliche Oidien, die in Form und Größe von den normalen Oidien erheblich abweichen.

Bredemann (1909) beobachtete Mikroidienbildung von B. amylobacter.

1. Bei nicht optimaler Ernährung, z. B. in Nährlösungen ohne Zusatz von Kreide, die sonst diesen zur Neutralisierung der gebildeten Säure zugesetzt worden war.

2. Bei nicht optimaler Temperatur, z. B. einer stark nach unten oder oben von der optimalen abweichenden Temperatur.

3. Bei Strichkultivierung, d. h. häufiger Überimpfung des vor der Aussaat nicht erhitzten Keimmaterials.

In den Kulturen von Bacillus probatus konnte ich ebenfalls, wenn auch nur vereinzelt, Mikroidien beobachten; die Ursache ihrer Bildung war auch hier in ungünstigen Verhältnissen, wie starker Schwächung durch ungünstige Ernährung, ungünstige Temperatur und andere schädliche Einflüsse zu suchen. So beobachtete ich einmal in einer 2 Monate alten, wenig alkalischen Bouillonkultur Mikroidien (Fig. 50); ferner wurden sie in geringer Anzahl auf ⅓ D-Agar + 0,1 Proz. Na_2CO_3, der mit 9 Stunden lang auf 80° C erhitztem Sporenmaterial geimpft worden war, gebildet; eine stark geschwächte Kultur, die ausgehend von abgekochtem Sporenmaterial einer kräftigen Kartoffel-Kreidekultur, auf $^1/_5$ D-Agar bei 46° gewachsen war, zeigte ebenfalls neben ganz wenig Stäbchen einige Mikroidien. Zuweilen traten Formen auf, die zweifellos das Anfangsstadium der Mikroidienbildung der Stäbchen waren (Fig. 50).

Versuche, die Mikroidien zu isolieren, um sie getrennt von den Stäbchen auf morphologische und physiologische Eigenschaften zu untersuchen, waren bei Bac. probatus-Material nicht auszuführen, weil, wie schon betont, in meinen Kulturen nur vereinzelt und nur mehr zufällig Mikroidienbildung eintrat; diese unterblieb nahezu ganz, wenn ich häufig auf neuen Nährboden überimpfte und dabei jedesmal von jungem kräftigen, aber nicht vor der Aussaat erhitztem Materiale ausging.

Ich machte daher Versuche mit einem Materiale, das nach Bredemann (1909) regelmäßig bei Strichüberimpfung nicht erhitzter Bakterien Mikroidien bildet.

Das Versuchsmaterial war der Stamm F des Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann. Nahezu täglich wurden junge, kräftig schwärmende Oidien auf neuen D-Agar übertragen und unter optimalen Bedingungen bei 28° C aufbewahrt; es gelang mir jedoch nicht, Mikroidien zu erhalten. Die Kulturen machten nicht einen geschwächten Eindruck, sondern im Gegenteil einen gekräftigten. Die Versuche, Mikroidien zu züchten und zu isolieren, wurden dann abgebrochen.

Nach meinen jetzigen Erfahrungen (siehe auch p. 10 ff.) bin ich überzeugt, daß bei Strichüberimpfung ganz jungen, kräftigen Bakterienmaterials unter Voraussetzung optimaler Kulturbedingungen keine Schwächung, sondern eine Stärkung eintritt. Impft man dagegen älteres, durch Stoffwechselprodukte schon mehr oder weniger stark geschwächtes Material auf neuen Nährboden über — da nicht abgekocht, zum Teil mit den Stoffwechselprodukten —, so können unter Umständen selbst optimale Ernährungsbedingungen nicht ausreichen, die Schwächung der Zellen wieder aufzuheben.

Ursache der Mikroidienbildung in den Bredemannschen Untersuchungen war also danach weniger das Unterlassen der Abkochung, als vielmehr die Überimpfung geschwächten Oidienmaterials.

Degenerations- oder Schwächungsformen.

Bei ungünstigen Kulturbedingungen, z. B. bei maximaler Temperatur, maximalem und minimalem Sauerstoffdruck trat eine starke Schwächung der Bakterien ein. So unterblieb die Sporenbildung, die Stäbchen wurden gewöhnlich länger und vor allem dünner als die unter normalen Verhältnissen beobachteten ausgebildet; in den Stäbchen traten verschiedene mehr oder weniger stark lichtbrechende Kugeln und unregelmäßige Massen auf; einige dieser Kugeln schienen bei tiefer Einstellung etwas heller zu sein als bei hoher, sie färbten sich mit Methylenblaulösung (1 + 10), wurden nach Zugabe von 1 Proz. und 5 Proz. H_2SO_4 wieder entfärbt und waren somit mit unbekannten Stoffen angefüllte Zytoplasma-Vakuolen. Die bei hoher Einstellung stärker lichtbrechenden Kugeln waren wahrscheinlich Fettkugeln (siehe weiter unten). Auf Zusatz von Chloralhydratlösung (5 + 2) verschwand jede Differenzierung des Stäbchenplasmas. Degenerierte Stäbchen, die neben normalen in einer 4 Wochen alten, mit 5 Proz. Pepton und 0,2 Proz. Ammoniumkarbonat versetzten Bouillon gewachsen waren, wurden auf Fett untersucht.

Zum Fettnachweis wurde die Bouillon mit einer Mischung gleicher Teile Sudan-Alkohol und 1-proz. Natriumkarbonatlösung zusammengebracht und nach längerem Stehen bei bestem Tageslicht untersucht; einige Stäbchen zeigten 1—2 schwach rot gefärbte Kugeln, die vielleicht Fett waren. Diese Beobachtung stimmt mit denen anderer Autoren überein (Näheres siehe Kruse 1911. p. 49).

Weitere Untersuchungen, ob ein Teil der Differenzierungen in geschwächten Stäbchen auf Plasmolyse oder auf das Vorhandensein anormaler, membranloser Sporen zurückzuführen war, wurden nicht ausgeführt.

Reservestoffe.

Von den in Bakterienzellen vorkommenden Reservestoffen: Fett, Iogen, Glykogen und Volutin habe ich bei Anwendung der mikrochemischen Methoden und sonstigen Hilfsmittel (A. Meyer, 1903, I u. II, 1911, 1912) normalerweise nichts nachweisen können.

Kerne.

Mit Methylenblaulösung (1 + 10) konnte ich in Oidien, Fäden und ganz jungen Sporangien blaue Kugeln nachweisen, die auf Zusatz von 1- und 5-proz. Schwefelsäure in allen Fällen sofort entfärbt wurden. (Volutin wird nie sofort entfärbt.) In jungen Oidien, die sich kurz vor der Ausbildung einer Querwand befanden, wurde gewöhnlich eine Kugel in der Mitte des Stäbchens gefunden; war die Querwand eben ausgebildet, so konnte zuweilen je eine seitlich der gebildeten Membran liegende Kugel von nahezu gleicher Größe beobachtet werden. Es ist wahrscheinlich, daß diese Kugeln die Kerne waren (s. Fig. 45 u. 46).

Plasmolyse.

Da es uns hier darauf ankommt, das Eintreten oder Ausbleiben der Plasmolyse als Merkmal für die Speziesdiagnose heranzuziehen, so komme ich etwas eingehender auf die in der Literatur angegebenen Methoden des

Nachweises zu sprechen. Bezüglich der Literatur über Plasmolyse siehe Fischer, 1891, 1894, 1903; Vahle, 1909 und Kruse, 1911.

Zum Plasmolysennachweis empfiehlt Fischer (1903) die Züchtung der Bakterien auf einem Nährboden, dem er zur Erreichung eines möglichst niedrigen osmotischen Druckes folgende Zusammensetzung gab: 1 Proz. Pepton, 1 Proz. Rohrzucker, 0,5 Proz. Liebigs Fleischextrakt und Agar-Agar in der gewöhnlichen Konzentration. 20 Stunden altes, auf dem eben alkalischen, kochsalzfreien Nährboden gewachsenes Bakterienmaterial wird zunächst in einen Hängetropfen gebracht, der 0,2-mol = 1,17 Proz. NaCl enthält. Fischer beobachtete bei seinen Versuchen Bakterienspezies, die plasmolysierbar waren und solche, die nicht plasmolysierbar waren. Da der von Fischer angegebene Nährboden jedoch nicht in allen Fällen anwendbar ist, so muß man bei den durch die Züchtung an stärkeren osmotischen Druck gewöhnten Bakterien zum Plasmolysenachweis dann auch Lösungen mit stärkerem osmotischen Druck hinzusetzen. Vahle benutzte zum Plasmolysenachweis Lösungen mit 1, 2, 3, 5 und 10 Proz. Kochsalz, mit 3 Proz. Salpeter und eine von Raciborski (1905) angegebene konzentrierte Lithiumchloridlösung. Bei Anwendung der konzentrierteren osmotischen Lösungen erübrigt sich auch die Züchtung auf dem von Fischer empfohlenen Nährboden.

Der von mir auf Plasmolysierbarkeit untersuchte Bacillus robur A. M. et Neide zeigte selbst bei ganz starken osmotischen Lösungen — es wurden z. B. 10-proz. Salpeter- und 20-proz. NaCl-Lösungen angewandt — keine Plasmolyse. Bacillus robur gehört also demnach wie Bacillus oxalaticus (Vahle, 1909) zu den nicht plasmolysierbaren Bakterien.

Der Harnstoffspalter Bacillus probatus wurde ebenfalls auf Plasmolysierbarkeit untersucht; mit schwachen osmotischen Lösungen z. B. 0,2 mol Kochsalz, wie sie Fischer allerdings nach Vorzüchtung auf besonderem Nährboden zur Differentialdiagnose angewendet wissen will, konnte keine Plasmolyse erzielt werden; diese trat jedoch sehr schön ein, wenn dem in Wasser liegenden, mit einem Deckglas bedeckten Material seitlich ein Tröpfchen 10-proz. NaCl-Lösung zugesetzt wurde; 3 Ränder des Deckglases waren zuvor mit Wachs verschlossen worden. Die Kochsalzlösung diffundierte an der offen gelassenen Stelle in das Material hinein und zwar so langsam, daß alle Übergänge der Plasmolyse-Erscheinung beobachtet werden konnten (s. Fig. 63).

Die Färbung und Fixierung der Plasmolyse gelang mit Methylenblau- und Fuchsinlösung, die Membran konnte auf Zusatz von wenig Jodjodkaliumlösung (stark) deutlicher hervorgehoben werden; wässrige Farbstofflösungen bewirken nach Fischer (1893. p. 150) leicht eine Verquellung des kontrahierten Protoplasten.

Begeißelung.

Zum Nachweis der Begeißelung benutzte ich zuerst die Methode von Löffler (s. Meyer, 1903) und später mit großem Vorteil die von Zettnow angegebene und verbesserte Methode (s. Heim, 1911). Die Zettnowsche Methode erlaubte es mir auch, an die Untersuchung einiger bis jetzt wenig gelöster Fragen, wie Anzahl, Länge und Dicke der Bakteriengeißeln heranzutreten (siehe dazu auch das in A. Meyer, 1911, p. 105—141, Gesagte).

Soll die Geißelfärbung gut gelingen, so sind viele Einzelheiten zu berücksichtigen; bevor ich die Resultate meiner Untersuchungen bringe, gehe ich kurz auf einige dieser Einzelheiten ein.

Zum Geißelnachweis verwendet man nach meinen Erfahrungen am besten das lebhaft schwärmende Oidienmaterial einer etwa 10—20 Stunden alten Kultur; zur Erhöhung der Schwärmfähigkeit empfiehlt es sich, zuvor die Oidien mehrere Male hintereinander alle 24 Stunden in neue Nährböden zu übertragen. Das Bakterienmaterial wird mit Formol fixiert und durch sorgfältiges Auswaschen und Absetzenlassen in Spitzgläschen vom anhaftenden Nährboden befreit. Weniger klar sind die Bilder, die man durch direkten Ausstrich des mit Wasser gemischten und mit Osmiumsäure fixierten Oidienmaterials erhält.

Der Ausstrich gelingt am besten auf schwach angewärmten Deckgläschen (ich legte sie auf den 40° warmen Wärmeapparat), die völlig fettfrei sein müssen und während der ganzen Färbung nur mit der reinen Pinzette anzufassen sind. Es ist zweckmäßig, in Schnecken- oder Schlangenlinien auszustreichen und zwar so schnell und mit so wenig Substanz, daß der Ausstrich sofort nach der Berührung des Deckglases trocknet. Um möglichst feine Ausstriche zu bekommen, wurden Strichversuche mit Federn, Glasstäbchen, Glasröhren, entfetteten Haaren und Platindrähten verschiedener Dicke gemacht. Mit den Haaren und den Platindrähten der Dicke 0,25 mm konnte eine ganz dünne, augenblicklich trocknende Ausstrichfläche erzielt werden; die Platindrähte sind nur für die Ausstriche zu verwenden damit sie glatt bleiben und die Ausstrichflüssigkeit immer gut von ihnen abläuft. Bei der Beizung mit der Tanninbeize fand ich, daß eine 5 Minuten lange Beizung meist ausreichte, daß längere Beizung aber auch keinen Einfluß ausübte auf die Dicke junger Geißeln (s. auch p. 28). Die Versilberung habe ich nicht über der freien Flamme, sondern auf dem 60—70° warmen Wärmeapparat vorgenommen. Eine Verstärkung mit Goldchlorid war in meinen Versuchen nie erforderlich.

Resultate der Geißelfärbungen.

Alle Morphoden mit Ausnahme der freien Sporen sind begeißelt, die Anordnung der Geißeln ist eine peritrische.

Schwärmen der einzelnen Morphoden: Die Keimstäbchen schwärmen sofort nach der Keimung; es gelang bei den noch mit dem Sporenrest behafteten Keimstäbchen durch Färbung gewöhnlich 2—3 Geißeln sichtbar zu machen (Fig. 8, 52); außerdem fand ich in dem 6 Stunden alten, auf Ammon-Agar gewachsenen Materiale ein Keimstäbchen mit 10 Geißeln (Fig. 52); die Geißeln waren bei den 2—3 μ langen Keimstäbchen sehr dünn, gefärbt etwa 0,07—0,08 μ dick, und nicht länger als 3 μ.

Die Oidien zeigen besonders starke Bewegung in jungen, 1—2 Tage altem Zustand; auf festen Nährböden erhält sich die lebhafte Bewegung am längsten im Kondenswasser. Die Anzahl der Geißeln schwankt, wie ich vermute, nach dem Alter der Kultur und, wie ich vermute, nach Art der Fortzüchtung und nach der Stäbchengröße.

Fig. 53 zeigt ein Stäbchen, nach 30½ Stunden aus Sporen auf Ammon-Agar erwachsen; das Stäbchen ist 3,5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 6, die Dicke 0,09—0,1 μ, die Länge durchschnittlich 7 μ (es ist möglich, daß die eine nach der Zeichnung 10 μ messende Geißel keine Einzelgeißel ist).

Fig. 55 zeigt ein Stäbchen von einer 1 Monat alten aus Sporen auf Ammon-Agar

erwachsenen Kultur; das Stäbchen ist 3,5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 4, die Dicke 0,11—0,12 μ, die Länge 5 μ.

Fig. 23 zeigt ein Stäbchen einer 24 Stunden alten Strichkultur auf Ammon-Agar; das sehr bewegliche Material war nicht aus Sporen hervorgegangen, sondern durch sehr oftes, meist tägliches Überimpfen auf neuen Nährboden (130 Strichgenerationen) erhalten worden: das Stäbchen ist 10,5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 30, die Dicke 0,1 μ, die Länge 7 μ.

Fig. 57 zeigt ein Stäbchen einer 24 Stunden alten, auf Ammon-Agar, wie zuletzt geschildert erhaltenen Strichkultur: das Stäbchen ist 3 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 10, die Dicke 0,1 μ, die Länge 6 μ.

Fig. 33 zeigt ein Stäbchen einer 72 Stunden alten, durch Strichkultur wie oben erhaltenen Ammon-Agarkultur (160 Strichgenerationen): das Stäbchen ist 5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 12, die Dicke 0,1 μ und die Länge 6 μ.

Fig. 54 zeigt ein Sporangium einer 78 Stunden alten aus Sporen auf Ammon-Agar gewachsenen Kultur. Das Sporangium ist 4 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 7, die Dicke 0,1 μ, die Länge 5 μ.

Fig. 56 zeigt ein Sporangium einer 6 Monate alten aus Sporen auf Ammon-Agar erwachsenen Kultur. Das Sporangium ist 3 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 5, die Dicke 0,14, die Länge 3 μ; es ist mir fraglich, ob die längere Geißel eine Einzelgeißel ist (siehe die Unterbrechungsstelle).

Fig. 33 zeigt ein Sporangium einer 72 Stunden alten, aus sehr oft durch Strichkultur übergeimpftem Stäbchenmaterial (160 Strichgenerationen) hervorgegangenen Kultur. Das Sporangium ist 5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 12, die Dicke 0,1 μ, die Länge 6 μ.

Fig. 38 und 39 zeigen Hemangien einer 1 Monat alten aus Sporen auf Ammon-Agar erwachsenen Kultur. Die Hemangien sind 2—2,5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 2, die Dicke 0,1—0,13 μ, die Länge 1—2 μ.

Aus den Beobachtungen ergibt sich, daß die Keimstäbchen jedenfalls sehr schnell nach der Keimung Geißeln ausbilden; die Geißeln sind zwar dünn und nicht so lang wie die von späteren Entwicklungsstadien ausgebildeten, ihre Zahl kann sich aber schon der pro 1 μ Stäbchen beobachteten Geißel-Maximalzahl nähern oder gar ihr gleichkommen.

Die Geißel-Maximalzahl pro 1 μ Stäbchengröße berechnet betrug 3 Geißeln und wurde beobachtet bei einem Keimstäbchen und ferner bei Stäbchen, die durch sehr oftes Überimpfen auf neuen Nährboden gekräftigt und, wie das mikroskopische Bild und die größere Geißelzahl zeigte, zu erhöhter Geißelbildung angeregt worden waren. Daß die Geißelbildung durch das eben genannte Kulturverfahren wirklich angeregt werden kann, hat schon Ellis (1902/03) beobachtet.

Die Sporangien können unter den zuletzt genannten optimalen Bedingungen an Zahl der Maximalzahl annähernd entsprechende Geißeln ausbilden.

War eine Kultur durch Alter oder weniger günstige Kulturbedingungen geschwächt, so zeigten die Morphoden auch wenig Geißeln. Um nun entscheiden zu können, ob diese Umstände die Ausbildung einer geringeren Anzahl Geißeln oder andererseits die Abtrennung schon vorhandener Geißeln vom Bakterienkörper bedingen, suchte ich die Morphoden, die am meisten Geißeln zeigten, und genau nach freien Geißelresten. Es stellte sich dabei heraus, daß, wie aus dem früher Erwähnten zum Teil schon bekannt ist, gleich alte, aber unter weniger günstigen Bedingungen gezüchtete Morphoden weniger Geißeln ausbilden, wie unter optimalen Bedingungen gezüchtete. In alten Kulturen zeigen die Morphoden nur wenig erhaltene Geißeln; vom Bakterienkörper abgetrennte Geißelreste findet man aber dort recht häufig.

Die Geißeldicke junger Stäbchen und Sporangien war nahezu konstant

0,1 μ, die der Keimstäbchen betrug nur 0,07—0,08 μ, die alter Stäbchen und alter Sporangien dagegen bis 0,14 μ.

Daß die ersten Entwicklungsstadien zartere Geißeln haben, ist auch von anderen Autoren (s. A. Meyer 1912. p. 130) beobachtet worden. Das Dickerwerden der Geißeln bei monatealten Morphoden führe ich wie Fischer (1895) auf die größere Quellbarkeit alter Geißeln zurück.

Die Durchschnittslänge der Geißeln junger Stäbchen und Sporangien schwankt nur wenig: von 5—7 μ; dabei ist noch zu berücksichtigen, daß die Längenmessungen der Geißeln nicht unbedingt genau sein können, weil man bei peritrich begeißelten Bakterien die Anheftungsstelle, d. h. Durchbruchsstelle der Geißeln nicht genau sieht.

Ich habe bei meinen Messungen angenommen, daß die Spiraldrehung bei dem Antrocknen und Färben aufgehoben wird und somit die beobachteten Windungen als Linie gerechnet.

Die Keimstäbchen haben nur kurze Geißeln, diese sind höchstens 3 μ lang; monatelalte Morphoden haben zuweilen ebenfalls nur ganz kurze Geißeln, das sind jedoch dann immer Geißelreste.

Eine deutliche Beziehung der Geißellänge zur Stäbchenlänge, wie sie Reichert (1909. p. 81, A. Meyer, 1911. p. 124) beobachtet hat, habe ich nicht feststellen können, dagegen stimmen meine Angaben bis zu gewissem Grade mit anderen Beobachtungen (A. Meyer, 1911. p. 130) überein.

Fischer (1893. p. 87) und Migula (1904. p. 75) heben die Ungenauigkeit der Messungen von Geißeldicken hervor wegen ungleich großer Quellung der Geißeln durch Einwirkung von Beize bei Vornahme der Färbung. Ich habe jedoch bei jungem, kräftig schwärmendem Stäbchenmaterial eine durch Beize hervorgerufene Quellung der Geißeln nicht feststellen können, obwohl in einzelnen Versuchen die angewendete Zettnowsche Beize verschieden lange Zeit bis über eine Stunde eingewirkt hatte. Die Geißeldicke blieb konstant 0,1 μ.

Um festzustellen, ob die Abtrennung der Geißeln vom Bakterienkörper durch Abwerfen (Fischer, 1895) oder Abreißen (Reichert, 1909. p. 42, A. Meyer, 1911. p. 132) erfolgt, habe ich die Einwirkung verschiedener äußerer Einflüsse auf die Schwärmfähigkeit der Bakterien und auf die Erhaltung ihres Geißelbelages untersucht.

1. Einfluß höherer Temperatur.

a) Eine 2 Tage alte auf Ammon-Agar gewachsene Strichkultur wurde 2 Stunden bei 60° C in den Brutschrank gestellt und das Material darauf zur Geißelfärbung benutzt. Die Geißeln waren, wie Fig. 58 zeigt, nicht abgeworfen worden.

b) Das feucht ausgestrichene und in reichlich Flüssigkeit liegende, geißeltragende Bakterienmaterial einer jungen Ammon-Agarkultur wurde auf 80° warmem Wärmeapparat erwärmt und zeigte ebenfalls nach der Geißelfärbung keinen Verlust des Geißelbehanges.

2. Einfluß plasmolysierender Lösungen.

Bei Zusatz von 3-proz. Kochsalzlösung zu dem schwärmenden Stäbchenmaterial trat neben der Plasmolyse auch Unbeweglichkeit ein; nach dem Entfernen der Kochsalzlösung trat die Beweglichkeit der Stäbchen wieder ein; die Geißeln waren also erhalten geblieben und nicht abgeworfen.

3. Einfluß der Präparierung.

Reichert (1909) beobachtete, daß Bewegung von flüssigen Kulturen auf das Abreißen von Geißeln einen viel geringeren Einfluß ausübte als die Verdunstungsströmung, die beim Austrocknen der Flüssigkeitstropfen einer Schwärmerkultur eintrat.

Diese Beobachtung Reicherts kann ich insofern bestätigen, als ich bei den Geißelfärbungen von eingetrockneten Flüssigkeitströpfchen und Ausstrichen an deren Rande, wo also die größte Verdunstungsströmung geherrscht hatte, die Bakterienzellen gewöhnlich geißelarm oder gar geißelfrei fand; die abgerissenen Geißeln lagen dabei meist in der Strömungsrichtung.

Gramdauer.

Bei Ausführung der Gram dauerbestimmung habe ich mich genau an die Vorschrift von Neide (1903) gehalten. Bevor ich zu den Versuchen mit Bac. probatus überging, habe ich zuerst nochmals die Angaben für die Gram dauer von Bac. robur nachgeprüft und kann danach die Brauchbarkeit der Methode für speziesdiagnostische Zwecke bestätigen.

Zur Bestimmung der Gram dauer von Bac. probatus verwendete ich Stäbchen einer 3 Tage alten, bei 28° auf Ammon-Agar gewachsenen Kultur; die Stäbchen befanden sich gerade vor der Sporenbildung, zeigten aber zum größten Teile noch keine Sporenanlagen. Alle 5 Minuten wurde der Grad der Entfärbung in Alkohol betrachtet: Dabei ergab es sich, daß nach 30 Minuten langem Verweilen in 28° warmem 80-proz. Alkohol die nach Gram gefärbten Stäbchen völlig entfärbt waren, während sie nach 20 Minuten langem Verweilen darin den Farbenton des Testobjektes „Bac. tumescens" zeigten. Die Gram dauer für Bacillus probatus beträgt also 20 Minuten.

Giemsafärbung.

Die Färbungsversuche wurden im Anschluß an die Versuche mit Bac. sphaericus (siehe A. Meyer, 1911. p. 61—62) auch mit 3 Tage altem, auf Ammon-Agar bei 28° gewachsenen Stäbchenmaterial von Bac. probatus vorgenommen. Eine Öse Bakterienmaterial wurde mit gleichviel 1proz. Osmiumsäure gemischt, auf einem fettfreien Deckglase ausgestrichen, bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet, 10 Minuten in absoluten Alkohol gehängt und nach dem Abtrocknen mit Fließpapier gefärbt.

Zur Giemsa-Färbung wurde nach Angabe von Abel (1910. p. 104) eine Mischung von 10 ccm 30—40° warmen, völlig säurefreien destillierten Wassers und 10 Tropfen Giemsa-Lösung (Grübler, Leipzig) benutzt. Diese Mischung wurde in Glasschälchen auf den Ausstrich gegossen und nach 5 Minuten langem Einwirken durch neue warme Farblösung ersetzt, die gleichfalls 5 Minuten einwirkte. Nach dem Abspülen mit Wasser, darauffolgendem Absaugen mit Fließpapier und Trocknen wurde das Präparat in Kanadabalsam oder in Wasser gelegt.

Die Beobachtungen wurden vorgenommen bei Auerlicht mit $^1/_{12}$ Ölimmersion und Apochromat 2 mm, Apertur 1,30 (beide Linsen von Zeiß).

1. Untersuchung des bei 35° gefärbten, in Wasser liegenden Präparates.

Das Zytoplasma der Stäbchen war rot, rotviolett oder blauviolett gefärbt. Bei hoher Einstellung sah man bläulich gefärbte Körner in verschiedener Anzahl und verschiedener Größe. Bei mittlerer Einstellung verschwanden die Körner, die demnach nur äußerlich an der Membran ange-

klebt waren; dafür traten meist 2—3 tiefblaue, zuweilen auch deutlich blaurote Körner gleicher Größe auf (s. Fig. 47), die auf Zusatz 1proz. Schwefelsäure sofort entfärbt wurden; vermutlich waren es Kerne.

2. Untersuchung des bei 40° gefärbten, in Kanadabalsam liegenden Präparates.

3. Untersuchung des bei 30° gefärbten, in Kanadabalsam liegenden Präparates.

Die Untersuchung 3 ergab eine etwas schwächere Färbung als die Untersuchung 2; beide in Kanadabalsam gelegten Präparate zeigten dieselbe Erscheinung als das in Wasser liegende Präparat, nur waren alle Farbtöne durch die Aufhellungskraft des Kanadabalsams weniger tief.

Da die Färbung die schon bekannten Einschlüsse der Bakterienzelle nicht deutlicher zeigt, als andere, weit einfacher zu handhabende Farblösungen, dabei noch leicht zu Täuschungen Anlaß geben kann, so scheint ihre weitere Anwendung nicht empfehlenswert.

Chitin. Nachweis und Vorkommen.

(Siehe auch A. Viehoever, 1912. p. 443—458.)

Nachweis: Das Chitin wurde mit der van Wisselinghschen Reaktion nachgewiesen. Zur Ausführung dieser Reaktion wurden mehrere Ösen kräftig entwickelten Bakterienmaterials in kleine, mit etwa 1 ccm 50proz. Ätzkalilösung beschickte Glasröhrchen gebracht und die Gläschen dann zugeschmolzen. Da in der Literatur eine Angabe über die erforderliche Dauer der Erwärmung für Bakterien nicht zu finden war, wurden Versuche bei 15, 60 und 90 Minuten langer Einwirkung von 6 Atmosphären im Autoklaven angestellt. Das Ergebnis war, daß eine 15 Minuten lange Erhitzung im Autoklaven bei 6 Atmosphären Druck = 164° C für Bac. probatus und Sporodinia, das als Testobjekt diente, völlig ausreichte, um das Chitin in Chitosan zu verwandeln; vermutlich genügt diese Dauer auch für die anderen Bakterienspezies. Die kurze Erwärmung hatte noch den Vorteil, daß die weniger widerstandsfähigen Morphoden zum Teil erhalten blieben. Nachdem das im Autoklaven erhitzte Material erkaltet war, wurden die Gläschen geöffnet und ihr Inhalt auf Uhrschälchen ausgeleert. Nach dem Absetzen des Rückstandes wurde die überstehende Flüssigkeit mit der Pipette weggenommen, der Bakterienrest dann in ähnlicher Weise nacheinander mit 75-, 50- und 25-proz. Glyzerin — nach der Angabe von Garbowski (1907) — sorgfältig ausgewaschen; hierauf auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckglase bedeckt, das an zwei Seiten mit Wachsstreifen auf dem Objektträger befestigt wurde.

Dann ließ ich im Überschuß durch Absaugen mit Fließpapier Jodjodkaliumlösung (2 g Jod, 1 g Jodkalium und 200 ccm Wasser) zu dem Präparate fließen und verdrängte diese dann wieder in gleicher Weise völlig durch überschüssigen Zusatz von 1proz. Schwefelsäure.

Versuchsmaterial.

Als Versuchsmaterial wurde zuerst eine 8 Tage alte und eine 13 Monate alte, auf Ammon-Agar gewachsene Kultur von Bac. probatus benutzt.

Es gelang mir, mit der oben erwähnten Methode das Chitin in den Membranen aller Morphoden dieser Spezies: in Oidien, Sporangien, Hemangien (Sporen umschließende Sporangienhälften) und Sporen, auch in leeren Sporen- und Sporangienmembranen, einwandfrei nachzuweisen.

Die Chitosan- oder Mykosinreaktion wurde meist erst sichtbar, sobald das Jod durch die Schwefelsäure verdrängt worden war. Die Färbung ist nicht immer sehr deutlich zu sehen, der Farbenton ist nicht immer rein violett; in ein und demselben Präparate kann man z. B. neben deutlich violett gefärbten Gebilden solche mit schwarz-violetter, rotvioletter, braunvioletter und dunkelrotbrauner Farbe beobachten; ja einige können auch braun oder ganz farblos sein.

Eine schwache gelbliche bis bräunliche Färbung zeigen auf Zusatz der oben erwähnten Jodjodkaliumlösung die Bakterienreste dann, wenn sie noch unzersetztes Chitin enthalten, also besonders vor der Erhitzung mit Kalilauge.

Auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure schlug diese gelbliche bis bräunliche Färbung nie in eine violette um, sondern verschwand vollständig; ein Beweis dafür, daß nur das in Chitosan umgewandelte und nicht auch das unzersetzte Chitin die van Wisselinghsche Reaktion zeigt.

Als Vergleichsobjekt dienten beim Chitinnachweis Flügeldecken eines Käfers, ferner Pilzhyphen von Aspergillus glaucus und Sporodinia grandis Linck. Besonders gut eignen sich die plasmafreien Sporangienträger von Sporodinia, da sie gegen die Einwirkung der Kalilauge sehr widerstandsfähig sind und sehr deutliche Färbungen mit dem van Wisselinghschen Reagens geben.

Die Beobachtungen wurden vorgenommen mit Zeißscher Optik: Kompensationsokular 12 und 18, Ölimmersion 1/12 und Apochromatlinse (Apertur 1,40, Brennweite 2 mm).

Die Färbungen waren am besten bei Tageslicht (weißem Wolkenlicht) zu sehen; bei Verwendung der A. Meyerschen Mikroskopierlampe (Gasglühlicht) waren die Farbentöne ebenfalls zu sehen, hatten dann aber mehr einen Stich ins Rötliche.

Ich versuchte nun auch, die Kalilauge in der Kälte anstatt in der Hitze auf das Bakterienmaterial einwirken zu lassen, in der Annahme, daß dadurch die Struktur der Bakterien besser erhalten bleiben müsse und folglich auch der Nachweis des Chitins sich leichter gestalten müsse. Ich habe Oidien- und Sporenmaterial von Bac. asterosporus in kleinen Gläschen mit 50proz. Kalilauge zusammengebracht und nach 8 Tagen beobachtet: die Morphoden waren wohl zum Teil verändert — geschrumpft oder gequollen — aber im ganzen doch noch gut und deutlich zu erkennen. Nach Zusatz des van Wisselinghschen Reagens war nur ganz vereinzelt eine schwache violette Färbung zu sehen, der Umwandlungsprozeß war also nach achttägigem Stehen bei durchschnittlich 20° C noch nicht weit fortgeschritten. Das Bakterienmaterial blieb dann noch länger mit der Kalilauge in Berührung und wurde nach 1½ und nach 3 Monate langem Stehen bei ca. 20° nochmals untersucht: Während die van Wisselinghsche Reaktion nach 1½ Monaten bei den meisten Zellen noch nicht deutlich zu sehen war, schien der Umwandlungsprozeß des Chitins in Chitosan nach 3 Monaten vollendet, wenigstens trat eine sehr schöne und deutliche Färbung auf Zusatz des Reagens ein. Die Zerstörung der Zellen war hier nicht so groß, wenigstens waren die Sporen besser und in größerer Anzahl erhalten als in dem mit der Kalilauge erhitzten Bakterienmateriale.

Es wird sich also für die Fälle, in denen es nicht auf eine schnelle Entscheidung ankommt, immerhin empfehlen, das auf Chitin zu untersuchende Material auch in ähnlicher Weise monatelang bei Zimmertemperatur mit

50proz. Kalilauge in Berührung zu lassen. Bei ganz empfindlichen Objekten könnte man ja auch schwächere Kalilauge nehmen, müßte dann allerdings das Material wieder länger mit ihr in Berührung lassen.

Untersuchungen der Morphoden im Ultramikroskop.

(bezl. der Apparate und näherer Angaben siehe A. Meyer, 1911. p. 76—79.)

Meine Untersuchungen der Morphoden von B. probatus im Ultramikroskop bestätigten die allgemeinen Angaben von A. Meyer (1911): Ich hebe nur hervor, daß weder Kerne noch Einzelgeißeln zu sehen waren. Die Oidien zeigten innerhalb der hell leuchtenden Membran ein durchaus optisch leeres Zytoplasma; nur bei den degenerierten Stäbchen fanden sich helleuchtende Tröpfchen, die den früher beschriebenen entsprechen. Die in kräftigem Schwärmzustand mit Reichertscher Beize (Reichert, 1909) gefärbten Zellen zeigten nur ganz vereinzelt rotbraun gefärbte Geißeln oder Geißelreste.

Gewinnung einer Einzellkultur.

Übersicht über die Isolierungsmethoden.

Weder beim Kochschen Plattenverfahren, noch bei der von Hansen angegebenen fraktionierten Aussaatmethode kann man, da die mikroskopische Kontrolle fehlt, sicher sein, daß jede einzelne Kolonie nur aus einem Keim und nicht aus mehreren Keimen der gleichen Art hervorgegangen ist.

In der Literatur (siehe auch Burri, 1909. p. 3—6) sind nun drei Verfahren angegeben, die die Isolierung einer einzelnen Bakterienzelle bei gleichzeitiger mikroskopischer Kontrolle ermöglichen sollen:

1. Die Tröpfchenmethode von Lindner (1905 und 1908).

Prinzip: Mit einer Zeichenfeder werden auf ein Deckglas kleinste Tröpfchen einer Kulturflüssigkeit aufgetragen, in der die zu isolierenden Bakterien in geeigneter Weise verteilt sind. Die Deckgläschen werden, wie es auch bei der Herstellung und Untersuchung hängender Tropfen geschieht, mit dem Tröpfchen nach unten auf einen hohlen Objektträger gelegt und durch Vaselindichtung vor Verdunstung geschützt. Diejenigen Tröpfchen, die bei der mikroskopischen Kontrolle nur einen Keim enthalten, werden markiert und weiter beobachtet.

Diese Methode, die sich für die Isolierung von Hefezellen und Pilzsporen bewährt hat, nach Lindner (1908) auch für die Einzellisolierung größerer Milchsäurebakterien brauchbar ist, reicht jedoch für die Isolierung der meisten Bakterien nicht aus (siehe auch Burri, 1909): die verhältnismäßig schwach lichtbrechenden Keime heben sich zu wenig deutlich von dem hellen Grunde ab und werden ferner meist durch die am Grunde des Tröpfchens auftretenden Interferenzstreifen nahezu oder ganz unsichtbar gemacht.

2. Shouten (1899, 1901, 1905, 1911) empfiehlt einen Isolierapparat (Abbildung und Beschreibung siehe 1905, sowie in Küster, 1907), der es unter gleichzeitiger mikroskopischer Kontrolle ermöglichen soll, ein nur einen Keim enthaltendes Tröpfchen vermittels feiner Glasnadeln aus einer mit keimhaltiger Flüssigkeit gefüllten feuchten Kammer herauszunehmen und in keimfreie Nährflüssigkeit zu übertragen.

Der Apparat ist recht kostspielig (Preis 100 Mark), die Methode — wie auch Burri (1909) hervorhebt — sehr umständlich und aller Wahrscheinlichkeit nach nicht unbedingt zuverlässig.

3. Das Tuscheverfahren nach Burri (1909).

Prinzip: Feinste Tröpfchen einer geeigneten Keimtuschemischung werden mit einer Feder auf Gelatineboden aufgetragen, mit einem Deckglase bedeckt und mikroskopisch durchgemustert. Diejenigen Tuschetröpfchen oder Punkte, die nur eine Zelle enthalten, werden entweder auf der Gelatine weiter gezüchtet oder mit dem Deckglase, an dem sie haften bleiben, in einen für die Weiterzucht der isolierten Zelle geeigneteren Nährboden übertragen. Da die hellen Keime sich von dem dunklen Tuschegrund deutlich abheben, so läßt sich ihre Anzahl im Tuschepunkt mit Sicherheit feststellen; es bedarf nur einigen Geschickes und einiger Übung, um mit dieser einfachen Methode zum Ziele zu kommen.

Auf Grund zahlreicher Versuche empfehle ich nun folgende, von Burris Angaben zum Teil etwas abweichende Ausführung dieser Tuschemethode:

Beschaffenheit der Tusche und Vorbereitung der Tuscheverdünnung.

Als Tusche verwende man nur die Pelikantusche No. 541 der Firma Günther, Hannover (zu beziehen von Grübler, Leipzig); man verdünne 1 Teil mit 9 Teilen destilliertem Wasser und fülle je 5—10 ccm dieser Mischung in Reagensröhrchen, die nach der Sterilisation verschlossen und wenigstens 8—14 Tage zum Absetzen der in der Tusche meist vorhandenen Fremdteilchen beiseite gestellt werden. Zur Vermeidung von Infektion sowie von Verdunstung der Tuschemischung ist es zweckmäßig, die Wattepfropfen der Reagensgläschen mit Salizylspiritus (1 g Salizylsäure + 100 ccm Alkohol absolutus) zu tränken, die Wattepfropfen dann etwas in die Röhrchen hineinzuschieben und schließlich noch einen sterilen Korkstopfen aufzusetzen.

Herstellung der Bakterientuschemischung.

Bei Bedarf füllt man etwa je ½ ccm dieser sterilen Tuscheverdünnung in kleine sterile Reagensgläschen (ca. 6 cm lang, 0,6 cm Durchmesser). In dem ersten Gläschen verreibt man eine Spur des Bakterienmaterials, überträgt eine Öse dieser Mischung in das zweite Gläschen und so fort nach der Kochschen Verdünnungsmethode. Recht zweckmäßig ist es auch, in dem kleinsten Tuschepunkt etwa der zweiten Verdünnung die Anzahl der Bakterien festzustellen und dann noch soviel sterile Tusche zu der Verdünnung hinzuzusetzen, daß nach dem Umschütteln in einem Tuschepunkt gleicher Größe nur eine Zelle vorhanden sein kann; sind z. B. in einem Tuschepunkt der gewünschten Größe 4 Zellen gefunden worden, so gibt man noch 3 Teile Tusche zur Verdünnung hinzu. Ein Austrocknen der Keimtuschemischung läßt sich leicht durch Verschließen des Gläschens verhindern, die Mischung also so beliebig lange aufbewahren.

Anders ist es bei der Anordnung von Burri (1909), der die Herstellung der Bakterientuschemischung und -Verdünnung auf einem Objektträger vornehmen läßt. Burri will die Bakterien möglichst kurze Zeit nur mit der Tusche in Berührung lassen, da er Schädigungen der Zellen durch die Tusche befürchtet; er hält nun die Art der Tuscheverdünnung auf dem Objektträger für die schnellste: in mehrere größere, nebeneinander liegende Tuschetropfen überträgt er der Reihe nach immer kleinere Mengen des Keimmaterials, indem er Spuren des ersten Tropfens, gemischt mit Keimmaterial, in den zweiten überträgt und nach dem Verrühren Spuren des zweiten Tropfens in den dritten usw. Burri muß aber dabei mit dem Nachteil rechnen,

daß die Tuschetropfen in ganz kurzer Zeit austrocknen und die Keimverdünnungen dann immer wieder von neuem herzustellen sind, wenn sich bei der mikroskopischen Kontrolle eine Unbrauchbarkeit der Keimtuschemischung ergeben hatte.

Ich habe zur Feststellung einer schädlichen Wirkung der Tusche auf Bakterienzellen sporenbildende und nicht sporenbildende Formen längere Zeit mit der (1 + 9) verdünnten Pelikantusche in Berührung gelassen, aber in keinem einzigen Falle eine bemerkenswerte Schädigung der mit Tusche vermischten Bakterien beobachten können:

Bakterienspezies	Entwicklungszustand	Berührungsdauer mit Tusche	Übergeimpft auf günstigen Nährboden
Bacillus robur A. M. et Neide	4 Wochen alte Sporen	2 Tage	kräftige Entwicklung
Bacillus tumescens Zopf	4 „ „ „	2 „	„ „
„ „ „	4 „ „ „	4 Wochen	„ „
„ „ „	2 Tage alte Oidien	2 Tage	„ „
„ probatus A. M. et Viehoever	2 „ „ „	2 „	„ „
„ probatus A. M. et Viehoever	8 Wochen alte Sporen	3 Wochen	„ „
Pseudomonas Olivae A. M. et Meyer	4 Wochen alte Oidien	4 Tage	„ „

Es wäre ferner noch zu erwähnen, daß die in die Tusche eingeimpften 8 Wochen alten Sporen von Bacillus probatus vereinzelt schon in der Tusche zur Keimung kamen.

Bei diesen Versuchen ist allerdings nur die Wirkung der Tusche auf eine verhältnismäßig große Anzahl Keime und nicht die auf jeden einzelnen Keim ausgeübte berücksichtigt worden. Immerhin geht aus diesen, wie auch aus meinen Isolierungsversuchen hervor, daß von einer wesentlichen Schwächung der Bakterien durch Pelikantusche nicht die Rede sein kann; zudem wird man wohl bei der Herstellung von Einzellkulturen nie in die Lage kommen, Bakterien isolieren zu müssen, die tage- oder gar wochenlang in Tusche gelegen haben.

Auswahl des Isolierungsbodens.

Der beste Isolierungsboden ist Gelatine (siehe auch Burri, 1909), deren Konzentration jedoch von größter Bedeutung für das Gelingen kleinster Tuschepunkte ist. Bei 18° C nicht übersteigender Temperatur ist eine 10-proz. Gelatine noch brauchbar, bei höherer Zimmertemperatur wird man zweckmäßiger eine konzentriertere Gelatine verwenden; eine weiche Gelatine wird beim Aufsetzen der Feder fast regelmäßig verletzt.

Die Verwendung von Agar-Agar ist nicht zweckmäßig (siehe auch die übereinstimmenden Angaben von Burri, 1909), da Versuche mit ausgetrocknetem 1-, 2- und 3-proz. Agar folgende Resultate ergaben: Die Tuschetropfen lassen sich zwar gut auf der Agaroberfläche absetzen, aber, da sie meist in den Agar eindringen, nicht mehr wie bei der Gelatine unversehrt mit einem Deckgläschen abheben. Bei Agar treten die einzelnen Tuscheteilchen zudem so stark hervor, daß ein darauf oder dazwischen liegender Bakterienkeim nur sehr schwer zu sehen ist.

Herstellung der Tuschepunkte.

Nach zahlreichen Versuchen mit spitzen und stumpfen Zeichenfedern, Schreibfedern, feinen Glaskapillaren und dünnen, am Ende abgerundeten Glasfäden, empfehle ich nicht zu spitze Zeichenfedern zur Herstellung von Tuschepunkten. Ich benutzte schließlich nur die Goldfeder eines Füllfederhalters, die mit einer Iridiumspitze versehen war; eine Goldfeder wird zudem nicht abgegriffen, läßt sich leicht reinigen und keimfrei machen. Man wähle eine auf der Unterseite schwach kugelig verdickte Feder, da bei sehr spitzen Federn schon bei leichtester Berührung der Gelatineoberfläche die Gelatine verletzt wird, der Tuschepunkt zerfließt und unbrauchbar wird. Die sterile Feder tauche man etwa 2—3 mm tief in die Bakterientuschemischung und setze sie dann ganz vorsichtig wippend nahezu horizontal auf die Gelatineoberfläche auf; man kann auch — wie es Burri (l. c.) angibt — vorsichtig stechende Bewegungen mit der Feder ausführen, wird aber dabei — nach meinen Erfahrungen — sehr oft in die Gelatine stoßen.

Punktierung.

Die Tuschepunkte bringe man am besten in regelmäßigen Abständen auf die Gelatineschicht und lege, um die Punkte wieder leicht aufzufinden, bei der Ausführung der Punktierung unter die Gelatineplatte einen weißen Karton, auf dem die gewünschte Anordnung der Punktierung markiert ist. Die Tuschepunkte werden dann sofort mit Glassplittern oder mit 3—4 mm großen Deckgläschen bedeckt, die zuvor (zweckmäßigerweise zu mehreren im Heißluftschrank) zu sterilisieren sind.

Bei der Ausführung kann man mit Vorteil die neue binokulare Lupe von Zeiß benutzen. Zum Anfassen der kleinen Deckgläschen eignen sich sehr gut die Kühnschen Pinzetten.

Untersuchung der Tuschepunkte.

Die Petri-Schale mit Gelatine lege man nach dem Aufsetzen der Tuschepunkte ohne Deckel auf den Objekttisch des Mikroskops, suche jeden Punkt zuerst bei schwacher Vergrößerung auf, bringe ihn mit Hilfe des Fadenkreuzokulars in die Mitte des optischen Feldes und sehe mit einem starken Trockensystem (z. B. mit Objektiv E und Kompensationsokular 12 von Zeiß) nach, ob der Tuschepunkt nicht zu groß und die Verdünnung die richtige, d. h. nur eine Zelle in ihm vorhanden ist. Der Tuschepunkt soll an Größe das Gesichtsfeld des genannten optischen Systems nicht überschreiten, eine Forderung, die man nach einiger Übung wohl erfüllen kann.

Weiterzüchtung des isolierten Keimes.

1. Sind Bakterien zu isolieren, die unter den angegebenen Verhältnissen auf Nährgelatine wachsen, ohne diese schnell zu verflüssigen, so markiere man etwa mit steriler Tusche oder Farblösung auf dem Deckgläschen die Tuschepunkte, die bei der mikroskopischen Kontrolle nur einen Keim enthalten; die Gelatineschale stelle man dann bedeckt und vor Luftkeimen gesichert beiseite, beobachtet zuweilen die Vermehrung der isolierten Zelle und impfe schließlich von der daraus entstandenen Kolonie auf sterilen Nährboden über.

2. Einzelzellen von Bakterien, die nicht auf Gelatine wachsen oder diese sehr schnell verflüssigen, müssen in andere Kulturbedingungen über-

tragen werden: Den Tuschepunkt, der nur einen Keim aufweist, hebe man mit dem Deckglase, an dem ja — wie oben schon gesagt — der Tuschepunkt hängen bleibt, möglichst steril ab und übertrage ihn in solche Nährbedingungen, die für das Wachstum der betreffenden Zelle am günstigsten sind. Sehr zweckmäßig ist es jedoch auch, zur Weiterzüchtung Elektivnährböden zu nehmen (z. B. harnstoffhaltige Nährböden bei Harnstoffbakterien), um so eine Vermehrung eventuell vorhandener fremder Luftkeime in der Einzellkultur zu verhindern.

Zur Abhaltung der senkrecht herunterfallenden Luftkeime empfiehlt es sich, vor Beginn der Isolierung in geringer Höhe eine über das Mikroskop und einen Teil des Arbeitsplatzes reichende, horizontal an Stativen befestigte Glas- oder Metallplatte anzubringen.

Es ist immer zu raten, mehrere Isolierungen vorzunehmen, da die isolierte Zelle ja geschwächt oder gar tot sein kann; eine vergleichende Beobachtung der wichtigsten morphologischen und physiologischen Merkmale des durch Isolierung einer Zelle gewonnenen Stammes mit dem auf andere Weise gewonnenen Stamme ist am Ende natürlich unerläßlich.

Eigenschaften des aus einer einzelnen Spore hervorgegangenen Stammes von Bacillus probatus.

Zur Erzielung der Einzellkultur ging ich von abgekochtem Sporenmaterial der 30. Kulturgeneration aus, die auf Ammon-Agar gewachsen war. Die nach dem oben beschriebenen Tuscheverfahren isolierte Spore brachte ich in 2 Proz. Harnstoffbouillon zur Entwicklung und impfte die entstandenen Oidien auf Ammon-Agar über. Die Harnstoffspaltung in der Harnstoffbouillon, die typische Sporenbildung auf Ammon-Agar waren der Beweis, daß die Isolierung gelungen war.

Dieser Stamm wurde nun auch mindestens 4 Wochen nahezu täglich auf Ammon-Agar, ⅓ D-Agar + 2 Proz. oder 0,2 Proz. Harnstoff übergeimpft und bei 28° C gezüchtet. Die morphologischen wie physiologischen Eigenschaften waren dieselben, auch bezüglich der Schwankungen, wie die bei dem nach der Plattenkulturmethode isolierten Hauptstamme beobachteten und beschriebenen.

Sporengröße einer 4 Wochen lang auf Ammon-Agar fortgezüchteten Kultur:

	Längliche Sporen						Kugelige Sporen				
Länge	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0		0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Breite	0,5	0,6	0,5	0,7	0,8	Stück	1	9	64	8	3
Stück	1	4	1	2	7						

Die Intensität der Harnstoffspaltung (siehe Tab. X. p. 98) verhielt sich ebenfalls der bei dem Hauptstamme beobachteten gleich.

Kapitel 3.

Kulturelle Eigenschaften. Verwertbarkeit von Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen.

Kulturelle Eigenschaften.

Wachstum auf Agar-Nährböden.

Im Abschnitte über die Auswahl der für die Entwicklung und Sporenbildung günstigsten Nährböden (siehe p. 6) habe ich schon die wichtigsten Resultate meiner Kulturversuche mitgeteilt. Ich erwähne hier nur die auf-

fälligsten Wachstumserscheinungen und den Entwicklungsgang von Spore zu Spore auf Nährböden, die für die Kultur und Speziesdiagnose des Harnstoffspalters von Wert sind.

Resultate der Entwicklung.

1. D-Agar neutral. Geimpft mit Sporen und mit Oidien, die auf Harnstoff-Mineralagar gewachsen waren.

Auf dem neutralen Nährboden fand trotz wiederholten Überimpfens kein Wachstum statt.

2. D-Agar + 0,25 Proz. Na_2CO_3. Geimpft mit Sporen von Harnstoff-Mineral-Agar.

Das Sporenmaterial wurde ½ Minute im Wasserbad bei 100° erhitzt, die Kulturen bei 28° C gezüchtet.

Am 4. 12. geimpft.
„ 7. 12. beobachtet: noch keine makroskopische Entwicklung.
„ 8. 12. „ „ „ „ „
„ 9. 12. „ „ „ „ „
„ 10. 12. „ schwache makroskopische „
„ 11. 12. „ punkt- oder körnchenförmige Entwicklung; Kolonie rund, tröpfchen-milchglasähnlich, durchscheinend mit Opaleszenz.
„ 16. 12. „ am Grunde der schiefen Agaroberfläche zusammenhängender, grau bis gelblichweißer, opalisierend durchscheinender, dünner Belag.
Mikroskopisch: Oidien, z. T. mit körnigem Inhalt (geschwächter Zustand), ganz vereinzelt Sporangien mit Sporen.

Nach mehreren Abimpfungen gingen die Kulturen ganz ein.

3. D-Agar + 1 Proz. $CaCO_3$. Strichüberimpfung von Oidienmaterial (auf Harnstoff-Mineral-Agar gewachsen).

Innerhalb 14 Tagen war nur eine ganz schwache Entwicklung eingetreten.

4. Harnstoff-Mineral-Agar. Impfung wie bei Versuch 2.

Nach 5½—6 Stunden Keimung.
„ 70 „ Makroskopisch: schwach wolkige, dünne, weißliche Beläge.
Mikroskopisch: Schwärmer und Sporenanlagen.
„ 83 „ Makroskopisch: der Belag ist etwas kräftiger.
Mikroskopisch: Schwärmer, junge Sporangien und ein reifes Sporangium, d. h. eins mit stark lichtbrechender Spore.

Plattenkolonien von Harnstoff-Mineral-Agar, beobachtet am 4. Tage nach der Impfung mit abgekochten Sporen: Bis 2 mm große Kolonien; diese mit einem undurchsichtigen, weißlichgrauen Kern und einem weißlich-gelblichgrauen, opalisierend durchscheinenden Kranz. Die Kolonien rochen stark nach Ammoniak.

5. ⅓ D-Agar + 0,1 Proz. Natriumkarbonat + 2 Proz. Harnstoff, geimpft mit normal vorbehandeltem, d. h. 4 Wochen auf Ammon-Agar fortgezüchtetem Sporenmateriale, das vor der Impfung noch ½ Minute im 100° heißen Wasserbade erwärmt worden war.

Keimung, Wachstum und Sporenbildung waren etwas verzögert und geschwächt, die Stäbchen z. T. etwas dünner und länger wie gewöhnlich: Kristallbildung war nach 24—28 Stunden zu beobachten, nach dieser Zeit war gewöhnlich auch die Agaroberfläche bei der Durchsicht schwach wolkig getrübt, ein deutlicher Belag jedoch selbst nach längerer Zeit kaum zu sehen.

Durch nahezu tägliches Überimpfen der kräftigen Schwärmoidien in frisch hergestelltem Harnstoff-Agar gelang es jedoch, wie auch an anderer Stelle hervorgehoben ist, Generationen auf diesem Nährboden fortzupflanzen und zur Sporenbildung anzuregen.

6. ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Harnstoff. Impfung wie bei Versuch 5.

Nach 24 Stunden Makroskopisch: Trübung des Kondenswassers und eben sichtbarer Belag auf der Nährbodenoberfläche.
„ 48 „ Makroskopisch: Belag deutlich sichtbar, schwach gelblich, trübe durchscheinend.
„ 72 „ Makroskopisch: Belag etwas stärker.
Mikroskopisch: Schwärmoidien, z. T. mit jungen Sporenanlagen.

7. ⅓ D-Agar + 0,1 Proz. Na_2CO_3 + 0,2 Proz. Ammonkarbonat, auch Ammonagar von mir genannt.

Geimpft wie in Versuch 5.

Nach 5 Stunden Keimung.

„ 15 „ Makroskopisch: Kondenswasser ist schwach getrübt.
Mikroskopisch: reichlich Schwärmoidien.

„ 72 „ Makroskopisch: Deutlich sichtbarer, etwas erhabener, weißlich bis gelblichgrauer, etwas körniger, opalisierend durchscheinender Belag.
Mikroskopisch: Schwärmoidien und Sporangien mit junger Sporenanlage.

„ 96 „ Makroskopisch: kräftiger Belag.
Mikroskopisch: Schwärmoidien und zahlreiche Sporangien mit z. T. fertiger, stark lichtbrechender Spore.

Wachstum auf Gelatine-Nährböden.

Von den vielen Wachstumsversuchen, die ich auf Gelatine-Nährböden gemacht habe (siehe auch p. 67 ff.), erwähne ich nur den folgenden ausführlich, weil auf ihm das relativ beste Wachstum eintrat.

Nährboden: ⅓ D-Gelatine + 0,2 Proz. Ammoniumkarbonat.

Impfmaterial: 24-stündiges Oidienmaterial einer Ammon-Agarkultur.

a) Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht am 16. 8. 12. Nach 24 Stunden war deutliche Entwicklung zu sehen, der Stich hatte ein weißlichgraues, bei der Durchsicht schleierartiges Aussehen, einen spindel- oder rübenförmigen Wuchs und war etwa 2 cm tief in die Gelatine vorgedrungen. Es zeigte sich schon ein ganz schwacher Anfang der Verflüssigung, nach weiteren 2 Tagen ein kleiner, aber deutlicher Verflüssigungstrichter. Am 3. 10. 12 untersucht, war etwa 1 ccm verflüssigte Gelatine vorhanden, mikroskopisch wurden neben normalen dicke, z. T. angeschwollene Stäbchen, Mikroidien und Involutionsformen, aber keine Sporen beobachtet. Am 18. 12. 12 waren 2—3 ccm Gelatine verflüssigt.

b) Strich auf schräg erstarrter Gelatine am 16. 8. 12 ausgeführt. Nach 24 Stunden war ein dünner, weißlichgrauer Belag vorhanden, der in den nächsten Tagen glänzend und schleimig wurde. Am 22. 8. 12 war etwa ½ ccm, am 3. 10. 12 waren 2 ccm der Gelatine verflüssigt. In dieser Kultur wurden vorwiegend normale Stäbchen, sowie auch Sporenbildung beobachtet. Am 18. 12. 12 war das ganze Gelatineröhrchen, etwa 3—4 ccm, verflüssigt.

Da die Gelatine-Nährböden ihrer leichten Schmelzbarkeit wegen bei Zimmertemperatur gehalten werden mußten, das Wachstumsoptimum aber zwischen 28° und 35° liegt, so war das Wachstum im allgemeinen nicht sehr kräftig auf ihnen; der Entwicklungsgang von Spore zu Spore verlief auch nicht mit der bei Agar-Nährböden und 28° beobachteten Schnelligkeit und Regelmäßigkeit; es wurden meist dickere und längere Stäbchen, im allgemeinen aber weniger Sporen beobachtet, als auf den gleich zusammengesetzten Agar-Nährböden.

Wachstum auf Kartoffel.

Die Kartoffeln wurden nach Reinigung und Schälen mit dem Korkbohrer ausgestochen, die ausgestochenen Stücke schräg durchschnitten und die Keile teils ohne, teils mit Kreidezusatz im Dampftopf oder, was meist der Fall war, im Autoklaven ½ Stunde bei 125° C sterilisiert.

a) Während auf alten Kartoffeln ein Wachstum unsicher blieb, konnte es, wenn auch nicht gerade deutlich, auf jungen Kartoffeln beobachtet werden, zumal wenn sie zur Erhöhung des Feuchtigkeitsgehaltes mit 1 bis

2 ccm Wasser vor dem Sterilisieren versetzt worden waren; da wo das Wasser mit den Kartoffelstücken in Berührung war, hatte sich während des Erhitzens eine weiche Kartoffelmasse gebildet, auf der besseres Wachstum eintrat. Wenn auch normale Stäbchen und Sporen beobachtet wurden, so war doch die Entwicklung auf reinen Kartoffeln etwas geschwächt und verzögert.

b) Kartoffeln mit Kreidezusatz. Gutes Wachstum trat jedoch meist auf jungen Kartoffeln ein, die mit 1—2 ccm einer 2—5-proz. wäßrigen Kreideanschüttelung übergossen waren und nach dem Sterilisieren mit Material geimpft wurden, das auf harnstoffreien Nährböden gezüchtet worden war.

Der Belag war nicht immer deutlich von der Kartoffel zu unterscheiden; meist war er grauweiß bis gelblich gefärbt und am stärksten da ausgebildet, wo die Kartoffeloberfläche eine weiche Masse bildete. Der Verlauf des Entwicklungsganges von Spore zu Spore war nahezu derselbe, wie der auf Ammon-Agar beobachtete: d. h. bei 28° trat gewöhnlich nach 5—6 Stunden Keimung und nach 4 Tage langer Züchtung Sporenbildung ein. Die Stäbchen (s. Fig. 20—22) sind etwas dicker als die auf Ammon-Agar gebildeten, ebenso die Sporen (s. das Resultat der Sporenmessungen p. 19).

In älteren Kartoffelkulturen waren fast nur freie Sporen und Hemangien vorhanden, weniger Sporangien, noch weniger Stäbchen.

Wachstum auf Möhre.

Die Möhren wurden nach dem Abschaben der Oberfläche gereinigt und in längliche viereckige Stücke geschnitten, z. T. mit Kreide versehen und im Autoklaven bei 125° sterilisiert.

a) Möhre ohne Kreidezusatz. Als Impfmaterial dienten Sporen einer Harnstoff-Mineralagarkultur. Innerhalb 8 Tage langer Züchtung bei 28° war keine Entwicklung eingetreten.

b) Möhre mit 1—2 ccm einer wäßrigen 2—5-proz. Kreideanschüttelung versetzt: Die Entwicklung verlief ähnlich, wenn auch nicht so kräftig, wie die auf Kartoffelkreide beobachtete.

Die 6 Wochen alte Kultur zeigte makroskopisch einen dünnen, häutigen, weißlichgrauen und glänzenden Belag. Mikroskopisch waren sehr viele Sporen vorhanden.

Als Impfmaterial waren Oidien einer 24-stündigen Ammon-Agarkultur verwendet worden.

Wachstum in flüssigen Nährböden.

Die Untersuchung der Wachstumsmöglichkeit in flüssigen Nährböden ist von großer Wichtigkeit, denn sie ermöglicht bei Verwendung von Bouillon oder Milch, besonders aber bei Verwendung der vorwiegend konstant zusammengesetzten Nährlösungen von A. Meyer (1903. p. 24; bei Gottheil, 1901. p. 3) und der Berücksichtigung bestimmter Versuchsbedingungen, das Aufstellen weiterer, differentialdiagnostisch verwertbarer Merkmale; sie läßt auch ferner bei sorgfältiger Auswahl und Ergänzung der die Nährlösungen bildenden Substanzen erkennen, welche Ansprüche bezüglich seiner Ernährung der zu untersuchende Bazillus an Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen macht. Zu achten ist weiter auf die Bildung von Gasen, Giften, Säuren und Alkalien, Schleim usw., alles Stoffwechselprodukte, die sich nur oder doch viel besser in flüssigen als in festen Nährböden nachweisen lassen.

Die morphologischen Wachstumserscheinungen sind natürlich auch zu verfolgen, denn sie sind ja die unerläßliche Kontrolle für die Reinheit der Kultur. Die ausführliche Beschreibung des Wachstums und des Verlaufes der Entwicklung von Spore zu Spore in flüssigen Nährböden hat für die Speziesdiagnose gewöhnlich keinen großen Wert, da die Wachstumsverhältnisse in Flüssigkeiten meist weniger günstige und weniger gleichmäßige sind, als die auf festen Nährböden, auf denen demzufolge das Wachstum normaler und der Entwicklungsgang von Spore zu Spore schneller und regelmäßiger verläuft.

Zur Bestimmung der Entwicklungsstärke füllte ich nach dem im Marburger Institut (s. Gottheil, 1901; A. Meyer, 1903) üblichen Verfahren je 5 ccm der Nährlösungen in alkalifreie Reagensröhren (Firma Schott, Jena) von 15 cm Länge und 1,5 cm Durchmesser. Es fanden, wie auch aus der Tabelle hervorgeht (Tab. III), außer den A. Meyer schen Nährlösungen noch 1-proz. Peptonbouillon, 10-proz. Peptonwasser und Milch Verwendung, und zwar waren die Nährlösungen entweder lackmusneutral oder sie waren mit Natriumkarbonat 0,1 Proz. oder mit Ammoniumkarbonat 0,2 Proz. oder mit 2 Proz. Harnstoff versetzt worden. Die Nährlösungen wurden teils mit abgekochten Sporen ausgereifter, teils mit Oidien 24 Stunden alter, normal vorbehandelter Ammon-Agarkulturen geimpft; in den Lösungen, in denen nach 8 Tagen keine Entwicklung eingetreten war, wurde die Impfung wiederholt. Die Kulturen wurden bei 28° C gezüchtet.

Tabelle der Wachstumsintensität in Nährlösungen:

Tabelle III.

Nährlösungen	0	I	II	III	IV	V	Vα	Vβ	Vγ	Vδ	VI	VIα
Lackmus neutral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„ „ + Natr. carb. 0,1%	2	2	1	0—1	0	0	0	0	0	0	0	0
„ „ + Amm. carb. 0,2%	3	3	2	0—1	1	1					0	0
„ „ + Harnstoff 2,0%	3	3	2	1	1	1					0	0

VII	VIIα	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	Bouillon	Peptonlösung 1 : 10	Milch
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	
0	0	0	0—1	1	0	0	0	0	0	0	4	2	2
0	0	0	0—1	1	0	0	0	0	0	0	4	2	2

Intensitätstabelle: 0 bedeutet keine Entwicklung, Lösung völlig klar;
0—1 bedeutet ganz schwache Entwicklung, Lösung ganz schwach getrübt;
1 bedeutet schwache Entwicklung, Lösung schwach getrübt;
2 bedeutet deutliche Entwicklung, Lösung deutlich getrübt;
3 bedeutet kräftige Entwicklung, Lösung stark getrübt;
4 bedeutet sehr kräftige Entwicklung, Lösung sehr stark getrübt.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, fand in keiner der neutralen Nährflüssigkeiten ein bemerkenswertes Wachstum statt, ein Resultat, das wiederholt beobachtet wurde und das schließlich auch nach den Beobachtungen des Wachstums auf festen neutralen Nährböden erwartet werden konnte. Von den mit Natriumkarbonat versetzten Nährböden zeigten nur die peptonhaltigen eine Entwicklung, während in den asparaginhaltigen Nährlösungen

erst bei Gegenwart von Ammoniumkarbonat oder Harnstoff ein Wachstum eintrat. Die Zusätze von Ammonkarbonat oder Harnstoff ermöglichten auch in normaler, fetthaltiger, wie fettfreier Milch eine Entwicklung des Bacillus probatus.

Wachstumserscheinungen in Nährlösungen.

Die Art der Impfung ist oben angegeben. Bei keiner der untersuchten flüssigen Kulturen wurde Kahmhautbildung beobachtet. Die Bakterien bildeten im Anfang bei kräftigem Wachstum meist eine schleierartige Trübung in der Nähe der Flüssigkeitsoberfläche, die Trübung verbreitet sich dann gewöhnlich schlierenförmig durch die ganze Flüssigkeit und schließlich bildet sich fast immer ein Bodensatz, der je nach den Nähr- und Kulturbedingungen mehr oder weniger stark, mehr oder weniger schleimig ist; die darüber stehende Flüssigkeit kann selbst auch mehr oder weniger schleimig und fadenziehend werden. Die in den flüssigen Nährböden gebildeten Morphoden sind fast durchweg normal und einheitlich, als die, welche auf festen Nährböden unter optimalen Bedingungen wachsen: die Oidien werden dünner und länger, neigen wohl auch zur Fadenbildung, Involutionsformen und geschwächte Stäbchen treten häufiger auf, der Entwicklungsgang der Morphoden von Spore zu Spore ist nicht so regelmäßig, Sporen sind selbst in 4 Wochen alten Kulturen meist nur vereinzelt zu beobachten. Häufiger traten Sporen auf in den unter besonders günstigen Bedingungen gezüchteten asparaginhaltigen Kulturlösungen (s. Tab. VI).

Nährlösung 0 + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Nach 10 Tagen untersucht: Makroskopisch schlierenförmige Trübung, mikroskopisch normale und geschwächte Stäbchen.

Nährlösung I + 2 Proz. Harnstoff.

Nach 4 Wochen untersucht: Makroskopisch schlierig getrübte Flüssigkeit und trüber, schleimiger Bodensatz; mikroskopisch Oidien ein- und zweistäbig, von verschiedener Dicke und Länge, viele Involutionsformen, aber nur vereinzelt Sporenbildung (Fig. 44).

Nährlösung II + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Nach 4 Wochen untersucht: Makroskopisch schwach getrübte Flüssigkeit, schwach schleimiger Bodensatz; mikroskopisch vorwiegend sehr dünne und durchschnittlich etwa 10 μ lange Stäbchen und nur ganz wenige Sporen.

Nährlösung III + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Nach 4 Wochen untersucht: Makroskopisch kaum bemerkbare Trübung, mikroskopisch stark geschwächte Stäbchen, weder Sporangien, noch Sporen.

Bouillon + 0,1 Proz. Na_2CO_3 + 1 Proz. Pepton (Witte).

Nach 8 Wochen untersucht: Makroskopisch schlierig getrübte Flüssigkeit mit dickem, schleimig trübem Bodensatz; mikroskopisch ein- und zweistäbige Oidien verschiedener Dicke und Länge, vorwiegend aber Fadenbildung; unter den sehr langen Fäden (Fig. 41) war ein 103 μ langer; nur ganz wenige Sporen.

Bouillon + 5 Proz. Pepton + 0,2 Proz. Ammonkarbonat.

Die Versuche wurden mit je 20 ccm der Bouillon in alkalifreien Jenaer Kölbchen mit flachem Boden angesetzt und mit abgekochtem Sporenmaterial der 40. Kulturgeneration geimpft.

Nach 2-tägiger Kultur bei 28° wurde makroskopisch nur eine schwache Trübung, mikroskopisch auch nur ein schwaches Wachstum beobachtet.

Nach 4 Wochen war die Flüssigkeit intensiv getrübt und ein schleimiger, weißlichgrauer Bodensatz vorhanden. Mikroskopisch waren ziemlich dicke und lange, sonst aber normale Stäbchen, aber auch annähernd ebensoviel geschwächte Stäbchen gebildet. Sporenbildung wurde auch hier nur vereinzelt beobachtet.

Bouillon + 5 Proz. Pepton + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

In den wie oben angesetzten und geimpften Kulturen trat nur eine ganz geringe Entwicklung ein.

Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.

Die Beobachtungen, die ich beim Studium der Harnstoffspaltung in den später (s. Kapitel der Harnstoffspaltung) beschriebenen Kulturgefäßen machte, die 200 ccm faßten und 20 ccm der obigen Lösung enthielten, sind folgende:

Als Impfmaterial wurden 10 Millionen Sporen einer ausgereiften, normal vorbehandelten Ammon-Agarkultur benutzt, die ¼ Minute bei 100° erhitzt worden waren. Versuchstemperatur war 28°. Makroskopisch: Nach 15 bis 20 Stunden war zuerst eine schwache, aber doch deutliche schleierartige Trübung nahe der Flüssigkeitsoberfläche zu bemerken, ferner das vereinzelte Auftreten von ganz kleinen Kristallen, die bei der Durchsicht der ungeschwenkten Flüssigkeit aufleuchteten und bei fortschreitender Kulturentwicklung noch zahlreicher wurden. Die dann schlierig getrübte Flüssigkeit klärte sich immer mehr unter Bildung eines weißlichgrauen, später dunkler werdenden schleimigen Bodensatzes; dieser war schon nach einigen Tagen sehr dick, veränderte sich aber dann äußerlich nicht mehr sehr bei längerem Stehen der Kultur. Mikroskopisch: Nach 5—6 Stunden wurde Keimung beobachtet, nach 15—20 Stunden waren reichlich Schwärmoidien in den Kulturen, der größere Teil der Sporen also gekeimt.

Die Oidien waren vorwiegend dünner als die unter normalen Verhältnissen auf Ammon-Agar gewachsenen, neigten z. T. auch zur Fadenbildung und machten, zumal in der vergorenen Flüssigkeit, einen geschwächten Eindruck. Der Bodensatz bestand vorwiegend aus Stäbchen und Fäden, die in großer Zahl miteinander verschleimt waren. Sporen waren nur vereinzelt vorhanden.

Magermilch und Vollmilch.

In gewöhnlicher Milch fand kein Wachstum und keine Veränderung statt. Wurden der Milch aber 2 Proz. Harnstoff oder 0,2 Proz. Ammonkarbonat zugesetzt, so trat eine allmähliche Klärung, eine Peptonisierung des Milchkaseins ein; die Flüssigkeit wurde dick und schleimig, veränderte sich aber nicht sehr merklich vom 8. Tage der Kultur ab. Mikroskopisch waren normale und geschwächte Stäbchen und nur ganz vereinzelt Sporen vorhanden.

Bezüglich des makroskopischen und mikroskopischen Wachstums in anderen Kulturlösungen sehe man die folgenden Tabellen, vor allem die Tabelle VI.

Ansprüche an Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen.

Wenn auch die Resultate der auf Tabelle III verzeichneten Nährlösungsversuche schon manche Schlüsse bezüglich der Ernährungsbedingungen zu ziehen erlaubten, so schien es doch geboten, zur genauen Festlegung der Ansprüche an N- und C-Verbindungen weitere Versuche zu machen. Hierzu

wurden 50 ccm verschieden zusammengesetzter Nährlösungen in alkalifreie, 200 ccm fassende Erlenmeyer-Kölbchen mit flachem Boden gefüllt, in ähnlicher Weise wie die Nährlösungen der Tabelle III geimpft und ebenfalls bei 28° kultiviert; es hatte sich nämlich herausgestellt, daß unter den veränderten Kulturbedingungen ein besseres Wachstum eintrat, als in den Reagensglaskulturen mit höherer Flüssigkeitsschicht, aber geringerer Flüssigkeitsmenge.

Als Grundlösung diente in allen auf den Tabellen III—VII verzeichneten Versuchen die stickstoffreie mineralische Nährlösung, genannt M-Nährlösung, bestehend aus (s. A. Meyer, 1903. p. 15):

KH_2PO_4	1,0 g
$MgSO_4 + 7\ H_2O$	0,3 g
$CaCl_2$	0,1 g
NaCl	0,1 g
Fe_2Cl_6	0,01 g
Wasser	1000,0 g.

Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat setzt man zweckmäßigerweise zuletzt zu.

Tabelle IV.

Impfmaterial: Bei den Versuchen a Sporen der 63 auf Ammonagar gew. Kulturgeneration, bei den Versuchen b 24-stündige Oidien der 63 auf Ammonagar gew. Kulturgeneration. Versuchs-Temperatur 28° C. Versuchs-Dauer: Für jeden Versuch mindestens 2 Wochen. Kulturflüssigkeit: M-Nährlösung 50,0 + Natr. carb. 0,1%, der verschiedene N-Verbindungen und verschiedene Mengen Fleischextrakt zugesetzt wurden.

Stickstoff-Verbindungen 0,2 %	Versuch I		Versuch II	
	a enthält 0,05 g Fleischextrakt	b enthält 0,05 g Fleischextrakt	a enthält 0,1 g Fleischextrakt	b enthält 0,15 g Fleischextrakt
—	0	0	0	0—1
Harnstoff	0—1	1	1	1—2
Biuret	0	0	0—1	0—1
Glykokoll	0	0	0	0
Azetamid	0	0	0	0
Oxamid	0	0	0	0
Succinimid	0	0	0	0
Leuzin	0	0	0	0
Urethan	0	0	0	0
Harnsäure	0	0	0	0

Stickstoff-Verbindungen 0,2 %	Versuch III		Versuch IV		Versuch V
	a enthält 0,2 g Fleischextr.	b enthält 0,3 g Fleischextr.	a enthält 0,5 g Fleischextr.	b enthält 0,4 g Fleischextr.	a u. b enthält 0 g Fleischextr.
—	0—1	1	1—2	1—2	0
Harnstoff	1—2	2	3	3	0
Biuret	1	1—2	2	2	0
Glykokoll	0—1	1	1—2	1—2	0
Azetamid	0—1	1	1	1	0
Oxamid	0—1	1	1	1	0
Succinimid	0	0—1	1	1	0
Leuzin	0—1	1	1—2	1—2	0
Urethan	0—1	0—1	1	1	0
Harnsäure	0—1	0—1	1	1	0

Der alkalischen M-Nährlösung wurden, wie aus der Tabelle IV ersichtlich ist, organische Verbindungen, darunter Harnstoff und harnstoffverwandte Substanzen, zugesetzt, die z. T. möglicherweise gleichzeitig als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen konnten. Es trat jedoch kein Wachstum ein, wenn nicht bestimmte Mengen Fleischextrakt zugegen waren. Bei Gegenwart von Harnstoff war nur ein ganz geringer Zusatz von Fleischextrakt nötig, um ein Wachstum zu ermöglichen. Da aber bei gleich geringen Mengen Fleischextrakt ohne Harnstoff keine Zellvermehrung eintrat, diese wurde erst bei Zusatz von 0,3 Proz. Fleischextrakt beobachtet, so war damit bewiesen, daß der Harnstoff tatsächlich das Wachstum förderte. In ganz geringem Maße war das auch bei Biuret der Fall. Glykokoll, Leuzin, Azetamid und Oxamid übten keinen wachstumsfördernden Einfluß aus; sie, besonders aber Harnsäure, Urethan und Succinimid hemmten vielmehr etwas das Wachstum, konnten es allerdings bei genügendem Zusatz von Fleischextrakt nicht ganz verhindern.

Da der den Nährlösungen zugesetzte Fleischextrakt schon Ammoniak in geringen Mengen enthielt, so war es nicht angängig, ohne quantitative Ammoniakbestimmungen, den qualitativ in allen Kulturlösungen nachgewiesenen Ammoniak als Abbauprodukt der zugesetzten Stoffe anzusehen. Sehr wahrscheinlich ist es allerdings nicht, zumal bei Berücksichtigung des geringen Wachstums, daß die organischen Verbindungen, ausgenommen Harnstoff und vielleicht auch Biuret, von den Bakterien angegriffen und abgebaut wurden, da diesen ja im Fleischextrakt eine ausreichende N-Quelle zur Verfügung stand.

Tabelle V.

Impfmaterial: Bei den Versuchen a Sporen der 62. und 63. auf Ammonagar gew. Kulturgeneration, bei den Versuchen b 24-stündige Oidien der 62. und 63. auf Ammonagar gew. Kulturgeneration.
Beobachtung: Nach 3, 6, 10, 70 Tagen.
0 = keine Entwicklung, 1 = schwache Entwicklung.

Versuchs-No.	Zusammensetzung der Nährlösung				Wachstumskraft
	%	%	%	%	
1 a	M-Nährlösung 50,0	Natr. carb. 0,1	Dextrose 0,5	Harnstoff 0,2	1 (Schwärmoidien)
1 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	1 (Schwärmoidien)
2 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Kreatin 0,2	0
2 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	0
3 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Kreatinin 0,2	0
3 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	0
4 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Guanidin mur. 0,2	0
4 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ „ 0,2	0
5 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Thioharnstoff 0,2	0
5 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	0
6 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Cyanursäure 0,2	0
6 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	0

Wie aus der Tabelle V zu ersehen ist, findet in alkalischer M-Nährlösung bei Anwesenheit von Dextrose auf Zusatz von Harnstoff ein deutliches, wenn auch recht schwaches Wachstum statt. Setzt man aber statt

des Harnstoffes Kreatin oder Kreatinin, Guanidin, Thioharnstoff oder Cyanursäure zu der zuckerhaltigen M-Nährlösung, so tritt keine Bakterienentwicklung ein. Die genannten stickstoffhaltigen Verbindungen vermögen also den Harnstoff als Stickstoffquelle nicht zu ersetzen.

Aus den in Tabelle VI verzeichneten Versuchen geht hervor, daß Natriumnitrit als Stickstoffquelle nicht verwertbar ist, daß ferner, wie dies auch schon aus Tabelle III zu ersehen war, Asparagin allein mit alkalischer M-Nährlösung keine Wachstumsmöglichkeit gibt, daß aber auf Zusatz von Ammonkarbonat oder Harnstoff ein deutliches Wachstum zu erreichen ist. Dieses wird stärker, wenn Dextrose oder Saccharose und Glyzerin zugesetzt werden. Enthält die alkalische M-Nährlösung kein Asparagin, sondern außer Ammoniumkarbonat oder Harnstoff nur noch Dextrose, so ist das Wachstum ein recht schwaches und wird auch durch Glyzerinzusatz nicht stärker. Läßt man nun auch den Zucker weg, setzt man der alkalischen M-Nährlösung nur kohlensaures Ammonium zu, so tritt in dieser Nährlösung immer noch Vermehrung ein, Sporenkeimung und Oidienwachstum; allerdings ist dieses schwach, so daß es makroskopisch an einer Trübung kaum zu erkennen ist; dagegen konnte durch die weiter unten beschriebenen Zählversuche eine Vermehrung der Zellen nachgewiesen und damit gezeigt werden, daß kohlensaures Ammonium in einer stickstoff- und sehr wahrscheinlich auch kohlenstoffreien Salzlösung bis zu gewissem Grade von den Bakterien als Stickstoffquelle und, wie gesagt, sehr wahrscheinlicherweise auch als Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden kann.

Verwertbarkeit von Ammoniumkarbonat als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle.

Die zum Zwecke der Feststellung einer Verwertbarkeit von kohlensaurem Ammonium als N- und C-Quelle unternommenen Versuche sind aus der Tabelle VII zu ersehen.

Die bei einigen Versuchslösungen ausgeführten Keimzählungen wurden in der Thoma-Zeißschen Zählkammer vorgenommen. Die Beschreibung der Zählmethode siehe p. 84. Die Resultate dieser Zählungen waren folgende (s. auch die Tabelle VII):

Erste Zählversuchsreihe.
Versuchsmaterial war die 3 Wochen alte Versuchslösung 4 der Tabelle VII.
Zählung 1: Die Versuchslösung wurde nicht verdünnt.
„ 1: Auf 140 Quadrate kamen 43 Stäbchen, 41 Sporen
demnach „ 140 „ „ 84 Zellen
„ 1 „ „ 0,6 „
„ 1 ccm der Versuchslösung 4 = 0,6.4 Millionen,
„ 1 „ „ „ 4 = 2,4 Millionen Zellen.
Zählung 2: Die Versuchslösung wurde 1 : 3 verdünnt.
1 ccm der Versuchslösung 4
0,5 „ Kupferoxydammoniak
0,85 „ Schwefelsäure (3 Proz.)
0,65 „ Methylenblau (1 + 10).
„ 2: Auf 40 Quadrate kamen 4 Stäbchen, 5 Sporen
„ 40 „ „ 9 Zellen
„ 1 „ „ 0,225 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung = 0,225 . 4 Millionen = 0,9 Millionen
„ 1 „ „ Versuchslösung 4 = 2,7 Millionen Zellen.
Die Versuchslösung 4 enthielt demnach in 50 ccm 127 Millionen Zellen.

Zweite Zählversuchsreihe.
Versuchsmaterial war die 8 Tage alte Versuchslösung 5 d. Tab.

Tabelle VI.

Versuchs-Nummer	Zusammensetzung der Nährlösungen								
	M-Nährlösung	Natr. carb.	Ammon. carb.	Harnstoff	Asparagin	Dextrose	Rohrzucker	Glyzerin	Natr. nitrit
1	50,0 %				1 %				
2	50,0 %	0,1 %			1 %				
3	50,0 %	0,1 %					0,5 %		0,2 %
4	50,0 %	0,1 %	0,2 %						
5	50,0 %	0,1 %	0,5 %						
6	50,0 %	0,1 %	0,2 %			0,2 %			
7	50,0 %	0,1 %	0,2 %			0,5 %			
8	50,0 %	0,1 %		0,2 %		0,2 %			
9	50,0 %	0,1 %		0,2 %		0,5 %			
10	50,0 %	0,1 %	0,2 %			0,5 %		1 %	
11	50,0 %	0,1 %	0,2 %		1 %				
12	50,0 %	0,1 %		0,2 %	1 %				
13	50,0 %	0,1 %	0,2 %		0,2 %	0,5 %			
14	50,0 %	0,1 %	0,2 %		1 %	3 %			
15	50,0 %	0,1 %		0,2 %	1 %	3 %			
16	50,0 %	0,1 %	0,2 %		0,2 %		0,5 %	0,5 %	
17	50,0 %	0,1 %	0,2 %		1 %		0,5 %	1 %	
18	50,0 %	0,1 %		0,2 %	1 %		0,5 %	1 %	

Versuchs-Nummer		Beobachtungen						Nitritbildung
		nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 10 Tagen	nach 20 Tagen makroskopisch	nach 20 Tagen mikroskopisch	nach 6 Wochen	
1	a	0	0	0	0	—	0	—
	b	0	0	0	0	—	0	—
2	a	0	0	0	0	—	0	—
	b	0	0	0	0	—	0	—
3	a	0	0	0	0	—	0	—
	b	0	0	0	0	—	0	—

4	a	0	0	0	0—1	wenig Oidien	0—1	sehr schwach
	b	0	0	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
5	a	0	0	0	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
6	a	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
7	a	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
8	a	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
9	a	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
10	a	0	0	0	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0	0	0—1	„ „	0—1	„ „
11	a	0	0—1	1	1	viel Oidien, zieml. viel Sporen	1	„ „
	b	0—1	1	2	2	„ „ „ „ „	2	deutlich
12	a	0	0—1	0—1	0—1	„ „ „ „ „	1	schwach
	b	0	0—1	1	1	„ „ „ „ „	2	deutlich
13	a	0—1	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	sehr schwach
	b	0—1	0—1	1	1	„ „ „ „ „	1	„ „
14	a	0—1	2	3	3	sehr viel Oidien, viel Sporen	3	sehr stark
	b	0—1	2	3	3	„ „ „ „ „	3	„ „
15	a	0	2	3	3	„ „ „ „ „	3	„ „
	b	0—1	2	3	3	„ „ „ „ „	3	„ „
16	a	0	0	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	sehr schwach
	b	0	0—1	1	1	„ „ „ „ „	1	„ „
17	a	1	2	3	3	sehr viel Oidien, viel Sporen	3	stark
	b	2	3	3	3	„ „ „ „ „	3	„
18	a	0—1	1	2	2	„ „ „ „ „	2	„
	b	1	2	3	3	„ „ „ „ „	3	„

Impfmaterial: Bei den Versuchen a = Sporen der 62. und 63. Kulturgeneration (auf Ammon-Agar gewachsen);
b = Oidien der 63. und 64. Kulturgeneration (einer 24 Stunden alten Ammon-Agarkultur entnommen).

Intensitätstabelle: 0 bedeutet keine Entwicklung, Lösung völlig klar;
0—1 bedeutet ganz schwache Entwicklung, Lösung ganz schwach getrübt;
1 bedeutet schwache Entwicklung, Lösung schwach getrübt;
2 bedeutet deutliche Entwicklung, Lösung deutlich getrübt;
3 bedeutet kräftige Entwicklung, Lösung stark getrübt.

Zählung: Die Versuchslösung wurde folgendermaßen verdünnt:
1 ccm der Versuchslösung 5
1 „ Kupferoxydammoniak
1 „ Schwefelsäure (5 Proz.)
1 „ Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 : 4.
Zählung: Auf 120 Quadrate kamen 8 Stäbchen und 8 Sporen
„ 120 „ „ 16 Zellen
„ 1 „ „ 0,133 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,133 . 4 Millionen
„ 1 „ „ „ „ 0,532 „
„ 1 „ „ Versuchslösung 5 kamen 2,128 Millionen Zellen.
Die Versuchslösung 5 enthielt demnach in 50 ccm 106 Millionen Zellen.

Diese 106 Millionen Keime, Sporen und Stäbchen je zur Hälfte, waren aus 2,5 Millionen Keimen, etwa auch zur Hälfte aus Sporen und Stäbchen bestehend, innerhalb 8 Tagen bei 28° gewachsen.

Dritte Versuchsreihe der Keimzählungen.

Versuchsmaterial war die 5 Wochen alte Versuchslösung 6 und zwar 6 a, 6 b und 6 c der Tabelle.

Zur Zählung wurden die Versuchslösungen wie folgt verdünnt:
Je 1 ccm der Versuchslösungen 6 a, 6 b, 6 c
+ 0,5 ccm Kupferoxydammoniak
+ 0,85 „ Schwefelsäure (5 Proz.)
+ 0,65 „ Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 : 3.

Versuch A. Zählung der Versuchslösung 6 a, geimpft mit 0,2 ccm Impfmaterial.
Zählung 1: Auf 200 Quadrate kamen 54 Zellen
„ 2: „ 120 „ „ 36 „
„ 320 „ „ 90 „
„ 1 „ „ 0,28 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,28 . 4 Millionen Zellen
„ 1 „ „ „ „ 1,12 Millionen Zellen
„ 1 „ „ Versuchslösung 6 a kamen 3,36 Millionen Zellen
„ 50 „ „ „ „ „ 168 „ „

Diese 168 Millionen Zellen, bestehend aus Stäbchen und Sporen, waren aus rund 0,4 Millionen Zellen, zur Hälfte Stäbchen, zur Hälfte Sporen, innerhalb 5 Wochen bei 28° entstanden.

Versuch B. Zählung der Versuchslösung 6 b, geimpft mit 0,5 ccm der Versuchslösung 5.
Zählung 1: Auf 80 Quadrate kamen 20 Zellen
„ 1 „ „ 0,25 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,25 . 4 Millionen
„ 1 „ „ „ „ 1 Million Zellen
„ 1 „ „ Versuchslösung 6 b kamen 3 Millionen Zellen
„ 50 „ „ „ 6 b „ 150 „ „

Diese 150 Stäbchen und Sporen, bestehend aus Stäbchen und Sporen, waren aus rund 1 Million Zellen, zur Hälfte Stäbchen, zur Hälfte Sporen, innerhalb 5 Wochen bei 28° C hervorgegangen. Da die Zellzahl etwas kleiner ist, als die in Versuch 6 a und 6c beobachtete, so hebe ich hervor, daß in Versuch B, der lediglich zur Kontrolle dienen sollte, nur 80 Quadrate ausgezählt wurden und daß demzufolge die Zellzahl weniger absolut genau ist, als die der Versuche A und C, deren Zellzahl durch Auszählen von 320 und 200 Quadraten in dem letzten Falle gewonnen wurde.

Möglich ist allerdings auch, daß tatsächlich etwas weniger Zellen in dem Versuche 6b gebildet wurden.

Versuch C. Zählung der Versuchslösung 6 c, geimpft mit 1 ccm der Versuchslösung 5.
Zählung 1: Auf 100 Quadrate kamen 32 Zellen
„ 2: „ 100 „ „ 33 „
„ 200 „ „ 65 „
„ 1 „ „ 0,325 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,325,4 = 1 . 3 Millionen
„ 1 „ „ Versuchslösung 6 c kamen 3,9 Millionen Zellen.
„ 50 „ „ „ 6 c „ 195 „ „

Diese 195 Millionen Zellen, bestehend aus Stäbchen und Sporen, waren aus rund 2 Millionen Keimen, zur Hälfte Sporen, zur Hälfte Stäbchen, innerhalb 5 Wochen bei 28° C hervorgeangen.

Vierte Zählversuchsreihe.

Versuchsmaterial war die Versuchslösung 7, 3 Wochen alt. Zur Zählung wurde die Versuchslösung folgendermaßen verdünnt:

1 ccm der Versuchslösung 7
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+ 1 „ Schwefelsäure (5 Proz.)
+ 2 „ Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 : 5.

Zählung: Auf 100 Quadrate kamen 11 Stäbchen und 14 Sporen
„ 100 „ „ 25 Zellen
„ 1 „ „ 0,25 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,25 . 4 Millionen Zellen
„ 1 „ „ Versuchslösung 7 kamen 5 Millionen Zellen
„ 38 „ „ „ „ 190 Millionen Zellen.

Diese 190 Millionen Zellen, bestehend aus etwas mehr Sporen als Stäbchen waren aus rund 2 Millionen Zellen, zur Hälfte Sporen, zur Hälfte Stäbchen, innerhalb 3Wochen bei 28° hervorgegangen.

Wie aus der Tabelle VII hervorgeht, wurde als Ausgangsmaterial eine mit jungem, kräftigem Oidienmateriale geimpfte Kulturlösung benutzt, die außer M-Nährlösung und Ammonkarbonat noch eine bestimmte Menge Asparagin enthielt. Alle weiteren Versuchslösungen mit einziger Ausnahme der Versuchslösung 3 blieben frei von einem Asparaginzusatz, konnten also nur das in den ganz geringen Impfmengen mit übergeführte Asparagin enthalten. Die Mengen Asparagin, die so möglicherweise (s. die theoretisch der Verdünnung gemäß berechnete Gehaltstabelle) in die Nährlösungen hineingelangen konnten, sind so klein, daß sie praktisch wohl kaum berücksichtigt zu werden brauchen; zumal wenn man bedenkt, daß wir ja in den früheren Versuchen (s. Tabelle VI) bei Gegenwart von Ammonkarbonat eine Verwertbarkeit des Asparagins als Stickstoffquelle festgestellt haben und demnach zu Nährlösungen zugesetzte Spuren von Asparagin bei fortschreitender Kulturentwicklung aufgebraucht werden müssen. Die geringe Keimzahl von 127 Millionen Keimen in der Versuchslösung 4, die mit 0,2 ccm der ursprünglich bestimmt asparaginhaltigen Nährlösung 3 geimpft worden war, macht es wahrscheinlich, daß entweder kein Asparagin mit dem Impfmaterial in sie überführt wurde, oder daß ganz geringe Mengen Asparagin keinen wesentlich wachstumsfördernden Einfluß ausüben (s. auch das Versuchsresultat 16 der Tabelle VI).

Aus den Versuchen 6 a—6 c und 7, in denen etwas stärkeres Wachstum als in Versuchslösung 4 beobachtet werden konnte, scheint eine Anpassung an den Ammonkarbonatnährboden hervorzugehen.

Nehmen wir nun an, daß die genannten Nährlösungen 4—7, vor allem aber Versuchslösung 7, asparaginfrei sind, wozu wir wohl nach den mitgeteilten Beobachtungen berechtigt sind, dann ist mit der Feststellung des Wachstums in einer nur aus stickstoffreier Salzlösung und kohlensaurem Ammon bestehenden Nährlösung bewiesen, daß das kohlensaure Ammon die Stickstoffquelle sein muß. Da eine andere Kohlenstoffquelle als Ammonkarbonat der Kulturlösung nicht zugesetzt wurde, so muß demnach dieses in unserem Falle auch noch als Kohlenstoffquelle dienen. Nun wäre es ja denkbar, daß bei unserer Versuchsanordnung aus den zum Verschluß der Versuchskolben dienenden Wattepfropfen, oder aus der Luft, schließlich auch mit dem benutzten destillierten Wasser geringe Mengen kohlen-

stoffhaltiger, organischer Substanz in die Nährlösungen gelangt waren und so die Vermehrung der Zellen erst ermöglichten.

Tabelle VII.

Versuchs-Nummer	Nährlösung	Gehalt in g an		Versuchs-temperatur
		Ammon-Karbonat	Asparagin	
1	M-Nährlösung 50,0	0,1	0,5	28°
2	„ „ 50,0	0,1	0,002	28°
3	„ „ 50,0	0,1	0,025 008	28°
4	„ „ 50,0	0,25	0,000 100 032	28°
5	„ „ 50,0	0,25	0,000 002 006	28°
6a	„ „ 50,0	0,25	0,000 000 008	28°
6b	„ „ 50,0	0,25	0,000 000 020	28°
6c	„ „ 50,0	0,25	0,000 000 040	28°
7	„ „ 38,0	0,25	0,000 000 000 8	28°

Art und Menge des Impfmaterials	Versuchsdauer	Keimzahl am Ende des Versuchs	Keimzahl am Anfang des Versuchs
Oidien einer 24 Stunden alten Ammonagarkultur	2 Wochen	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt
ca. 0,2 ccm der Nährlösung des Versuches 1	2 „	„ „	„ „
ca. 0,2 ccm der Nährlösung des Versuches 2	2 „	„ „	„ „
ca. 0,2 ccm der Nährlösung des Versuches 3	3 „	127 Millionen	„ „
genau 1,0 ccm der Nährlösung des Versuches 4	1 „	106 „	2,5 Millionen
genau 0,2 ccm der Nährlösung des Versuches 5	5 „	168 „	0,4 „
genau 0,5 ccm der Nährlösung des Versuches 5	5 „	ca. 150 „	1 „
genau 1,0 ccm der Nährlösung des Versuches 5	5 „	195 „	2 „
genau 1,0 ccm der Nährlösung des Versuches 6c	3 „	190 „	4 „

Diese Annahme ist jedoch recht unwahrscheinlich: einmal stimmen die Keimzahlen der verschiedenen Versuche gut überein, welche Beobachtung auf gleichmäßige Ernährungsweise schließen läßt; ferner ist die allerdings für Bakterien recht minimale Vermehrung — im günstigsten Falle von 0,4 auf 168 Millionen Keime — doch immerhin größer, als wir sie uns durch so zufällige Verunreinigung wie die genannten entstanden denken können. Ganz exakt würden allerdings die Versuche nur genannt werden können,

wenn durch Verwendung eines ganz besonders reinen destillierten Wassers und durch einen anderen Kolbenverschluß jede Verunreinigung der oben angedeuteten Art vermieden worden wäre.

Unserer Anschauung gemäß müßte also der Bac. probatus zu den autotrophen Ammoniakbakterien zu rechnen sein, da er trotz starker Schwächung, die sich an der minimalen Vermehrung und seinem morphologischen Aussehen geltend macht doch mit Ammonkarbonat zur Not als N- und C-Quelle auskommen zu können scheint.

Bevor ich nun zum Schlusse dieses Abschnittes die Resultate meiner Versuche nochmals zusammenstelle, will ich kurz auf die Resultate anderer Forscher, die sich mit Harnstoffbakterien bezüglich deren Ansprüche an Stickstoff und Kohlenstoffquelle beschäftigt haben, eingehen oder doch wenigstens ihre Versuche erwähnen.

v. Jaksch (1881) machte umfangreiche Versuche mit Nährlösungen, welche die verschiedensten N- und C-Quellen enthielten; da seine Versuche aber nur mit Micrococcus ureae gemacht wurden, so kommen seine Resultate für uns nicht in Betracht.

Beijerinck (1901) konnte bei seinen Anhäufungsversuchen in reiner Harnstofflösung keine Bakterien zur Entwicklung bringen; setzte er aber dann Ammonoxalat, Natriumazetat, Ammonzitrat, Ammonmalat oder Kaliumnatriumtatrat hinzu, so wurde der Harnstoff durch die sich entwickelnden Bakterien abgebaut, wobei, wie es Beijerinck schien, ein bis zwei bestimmte, für die Kohlenstoffquelle charakteristische, Harnstoffbakterienformen erhalten wurden, die allerdings nicht isoliert wurden und vermutlich asporogen waren.

Die stärker harnstoffspaltenden Formen erhielt er bei seinen Anhäufungsversuchen erst dann, wenn in der Nährlösung eine vorzügliche N- oder C-Quelle zugegen war. Weitere Versuche bezüglich ihrer Ernährungsansprüche scheint Beijerinck mit Reinkulturen von Harnstoffbakterien nicht gemacht zu haben. Miquel (1898) fand, daß Pepton für Harnstoffgärer ein viel besserer Nährstoff ist als Harnstoff, daß aber nur das Pepton Chapoteau, nicht das von Witte brauchbar war.

Es geht nun aus meinen Versuchen bezüglich der Verwertbarkeit von Stickstoff- und Kohlenstoffquellen insgesamt hervor, daß Harnstoff als N- und C-Quelle nicht brauchbar ist, ebensowenig Biuret; in geringem Maße scheint es aber bei Ammonkarbonat der Fall zu sein und in deutlichem Grade ist es unter bestimmten Bedingungen (Alkalität der Nährlösung) bei Liebigs Fleischextrakt und Pepton (Witte) der Fall. Bei Gegenwart einer guten Kohlenstoffquelle können Harnstoff, Ammonkarbonat und auch Biuret in ganz geringem Maße als Stickstoffquelle dienen. Sind Harnstoff oder Ammonkarbonat in der Nährlösung zugegen, dann ist Asparagin ebenfalls als Nährquelle ausnutzbar; welcher Art ist zweifelhaft, doch vermute ich, daß Asparagin vorwiegend eine N-Quelle ist, da erst auf Zusatz guter C-Quellen, wie Dextrose, oder Rohrzucker und Glyzerin, eine kräftige Entwicklung in der Nährlösung eintritt.

Während auf festen Nährböden, z. B. D-Agar, selbst bei starker Alkalität bei 1 Proz. Traubenzucker gar kein oder doch nur ein kümmerliches Wachstum stattfindet, werden in einer asparagin- und ammoniumkarbonathaltigen Nährlösung noch 3 Proz. sehr gut vertragen und als Kohlenstoffquelle benutzt.

Nach neueren Versuchen (siehe Czapek, 1908) ist Urobacil-

lus pasteurii, der, wie wir sehen werden, mit Bac. probatus identisch ist, extrem saccharophob; unter saccharophoben Bakterien sollen solche verstanden sein, die nach Überimpfung aus stark verdünnter $^1/_{1000}$ Dextrose-Nährlösung in eine 12 Proz. Dextrose enthaltende nicht mehr wachsen können. Kontrollversuche habe ich in dieser Richtung nicht gemacht.

Will man aber als Merkmal für Harnstoffbakterien das Maximum des Traubenzuckerzusatzes festlegen, so darf man nur eine Nährlösung von konstanter Zusammensetzung und konstantem Alkalitätsgrad nehmen, muß von kräftigem, normal vorbehandeltem Bakterienmateriale ausgehen und besonders darauf achten, ob das Maximum des möglichen Zuckerzusatzes konstant genug ist, um als differentialdiagnostisches Merkmal für Harnstoffbakterien verwertbar zu sein.

Glykokoll, Leuzin, Azetamid, Oxamid, Succinimid, Harnsäure und Urethan, ferner Kreatin, Kreatinin, Guanidin, Thioharnstoff und Cyanursäure sind als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nicht verwertbar; die erste Gruppe von Glykokoll bis Urethan vermochte selbst bei Gegenwart von Fleischextrakt nicht das Wachstum zu fördern, die zweite Gruppe von Kreatin bis Cyanursäure ermöglichte auch auf Zusatz von Dextrose noch keine Bakterienentwicklung.

Kapitel 4.

Biophysikalische Eigenschaften. Verhalten der Morphoden gegen äußere Einflüsse: Temperatur, Sauerstoff, Gifte und Säuren.

Kardinalpunkte der Temperatur für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Temperaturminimum für Entwicklung:

Da die Bestimmung des Minimums keine besondere differentialdiagnostische Bedeutung hat, so wurde der Grenzpunkt der Entwicklung bei niedriger Temperatur nur annähernd festgestellt. Eine Woche bei etwa 3° aufbewahrte Kultur (Nährboden Ammon-Agar) zeigte keine Entwicklung; diese trat jedoch nachträglich wieder ein, als die Kultur bei 28° gezüchtet wurde. Eine andere Kultur wurde auf Ammon-Agar bei etwa 5° C zu züchten versucht; nach einer Woche war auch eine schwache Entwicklung eingetreten. Das Temperaturminimum der Entwicklung liegt also etwa zwischen 3° und 5°.

Temperaturoptimum für Entwicklung von Spore zu Spore:

Ich verfolgte, von Sporen ausgehend, die Entwicklung bis zum Auftreten der ersten reifen Spore bei den Temperaturen 28°, 32° und 35° C und sah die Temperatur als das Optimum an, bei welcher der Entwicklungsgang von Spore zu Spore zuerst beendet war. Diese Methode schließt den empfindlichsten Vorgang der Kulturentwicklung: die Sporenbildung ein. Zu den Versuchen wurde Ammon-Agar benutzt, der sich als Kulturboden am besten bewährt hatte.

Die erste reife Spore wurde zuerst auf den Ammon-Agarkulturen gebildet, die bei 32° gezüchtet waren und zwar wurden dazu 3 Tage benötigt, während bei den anderen Kulturen die Entwicklungsreife (d. h. reife Sporen) erst am 4. Tage beobachtet wurde.

Es war auch bei den durch die Züchtung auf 32° erwärmten Kulturen

das Kondenswasser zuerst getrübt und der Wachstumsbelag auf der Agaroberfläche zuerst zu sehen.

Das Temperaturoptimum für Entwicklung von Spore zu Spore liegt also unter den angegebenen Bedingungen zwischen 28° und 35°, bei etwa 32°.

Maximum für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Die Bestimmung der Maxima hat einen großen differentialdiagnostischen Wert, vorausgesetzt, daß man die Versuchs- und Kulturbedingungen genau festlegt. Selbstverständlich kommt als solche Bedingung auch die Vorbehandlung in Betracht. So kann man z. B. beobachten, daß Formen, die durch Kultur auf ungünstigen Nährböden ohnehin geschwächt werden, oder solche, die schon vor der zur Ausführung des Versuches erfolgten Überimpfung geschwächt waren, ein niedrigeres Maximum zeigen, als nicht geschwächte.

Maximum der Sporenkeimung:

Zur Bestimmung des Temperaturmaximums impfte ich eine größere Öse voll reifen Sporenmaterials in ganz wenig steriles Wasser, kochte einige Sekunden wie gewöhnlich ab und übertrug dann die Mischung auf Nährboden; ich nahm Agarnährböden, goß zuvor das Kondenswasser aus, und untersuchte dann nach mehreren Stunden in der am Boden der Agaroberfläche angesammelten Flüssigkeitsmenge nach gekeimten oder im Keimen begriffenen Sporen. Die Keimung war zuweilen nur schwer zu sehen, zumal wenn sehr wenig Sporenmaterial zugegen war oder sich die wenig lichtbrechenden Stäbchen stark bewegten; in solchen Fällen leistete mir eine Färbung mit Fuchsinlösung oder Methylenblaulösung gute Dienste.

Resultat: Wiederholt auf Ammon-Agar angesetzte Versuche ergaben, daß die Sporen von normal vorbehandelten, auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturen bei 45° noch keimten, dagegen bei 46° und 47° nicht mehr keimten. Sporen einer durch mehrere Generationen auf Kartoffel-Kreideboden gezüchteten Kultur keimten, auf Ammon-Agar gebracht, auch bei 46° noch vereinzelt aus, dagegen nicht mehr bei 47°.

Das Temperaturmaximum für die Sporenkeimung liegt also unter den angegebenen Bedingungen zwischen 45° und 47° C.

Temperaturmaximum für Oidienwachstum:

Die Feststellung, ob bei einer maximalen Temperatur noch eine Vermehrung der eingeimpften oder durch Keimen der Sporen entstandenen Zellen stattfindet, kann eigentlich exakt nur durch Zählen in der Zählkammer erfolgen; ich begnügte mich damit, festzustellen, ob makroskopisch noch eine ganz schwache, mikroskopisch noch eine deutliche Vermehrung zu beobachten war.

Resultat: 1. Versuch bei 43°. Sowohl Sporen wie junge Stäbchen normal vorbehandelter Kulturen wurden auf Ammon-Agar gebracht und bei 43° gezüchtet; es trat mikroskopisch wie makroskopisch sichtbare Entwicklung ein. Das Wachstum war allerdings wesentlich schwächer und trat auch später ein als bei 28°. Viele Stäbchen waren dünn und machten einen geschwächten Eindruck, Sporenbildung trat selbst nach vierwöchentlichem Stehen bei 43° nicht ein.

2. Versuch bei 44°. Es wurde dasselbe Impfmaterial wie in dem vorigen Versuch benutzt. Nach 12 Stunden wurde auf Ammon-Agar bei 44° vereinzelt Keimung der übergeimpften Sporen beobachtet. Nach längerem Stehen bei dieser Temperatur trat zwar Vermehrung ein, aber auch eine

sehr weitgehende Schwächung. Sporenbildung wurde ebenfalls nicht mehr beobachtet.

3. Versuch bei 45° (dasselbe Impfmaterial). Es trat zwar Keimung der übergeimpften Sporen z. T. ein, aber es fand weder ein makroskopisch noch ein mikroskopisch sichtbares Wachstum statt.

Das Temperaturmaximum für das Oidienwachstum liegt also demnach unter den angegebenen Bedingungen zwischen 44° und 45°.

Temperaturmaximum der Sporenbildung:

Die Bestimmung des Temperaturmaximums für die Ausbildung der Sporen macht keine Schwierigkeiten; darauf ist nur zu achten, daß man die auf Sporenbildung zu untersuchenden Kulturen nach der Entfernung aus dem Wärmeschrank sofort untersucht und event. wieder sofort in diesen zurückstellt, nicht aber dazwischen längere Zeit bei Zimmertemperatur stehen läßt.

Resultat: Sowohl Sporen wie junge Stäbchen normal vorbehandelter Kulturen wurden auf Ammon-Agar bei 42° gezüchtet. Die Entwicklung war deutlich, aber verzögert und geschwächt. In einem Falle, in dem von Sporenimpfmaterial ausgegangen wurde, war nach 5 Tagen makroskopisch auf der Oberfläche des Ammon-Agars ein dünner Belag gebildet, mikroskopisch waren neben normalen Stäbchen viel dünne, augenscheinlich geschwächte Stäbchen gebildet, nur vereinzelt wurde Sporenbildung beobachtet. Die Sporenbildung war selbst nach dreiwöchentlichem Stehen bei 42° noch recht schwach, wurden diese Kulturen aber noch längere Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so trat nachträglich wieder reichliche Sporenbildung ein; die Sporangien hatten dabei eine Form wie sie sonst seltener beobachtet worden war (Fig. 31—32). Hemangienbildung trat nur vereinzelt ein.

Alle Kulturversuche bei höheren Temperaturgraden setzen gute Feuchtigkeit sowohl im Nährboden wie im Wärmeschrank voraus, denn es ist sehr wohl denkbar, daß Resultate, die den Einfluß der Temperatur zeigen sollen, viel mehr den Einfluß des Wassermangels zeigen können, wenn nicht von vornherein für genügend Feuchtigkeit gesorgt ist und so der starken Verdunstung bei höherer Temperatur Rechnung getragen wird.

Gesamtresultat:	Kardinalpunkte der Temperatur für Sporenkeimung zwischen	Oidienwachstum zwischen	Sporenbildung zwischen
Minimum	3—5°	3—5°	3—5°
Optimum	28—35°	28—35°	28—35°
Maximum	45—47°	44—45°	42—43°

Kardinalpunkte der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Die Bestimmung der Kardinalpunkte wurde mit Hilfe der Apparate zur Kultivierung unter verminderter Sauerstoffspannung (A. Meyer, 1905) und unter erhöhter Sauerstoffspannung (A. Meyer, 1906) vorgenommen; siehe auch die Zusammenstellung dieser Methoden bei Brede-mann (1909. p. 27 ff.).

Um das Eindringen von Pilzhyphen in die Kulturröhrchen zu vermeiden (s. Bredemann, 1909. p. 69), wurden die Wattepfropfen nach dem Abbrennen ihres aus dem Röhrchen hervorragenden Teiles mit einigen Tropfen einer 1-proz. Lösung von Salicylsäure in absoluten Alkohol getränkt, die Kulturen ganz kurze Zeit bis zur Verdunstung des Alkohols beiseite gestellt und dann erst in die Kulturapparate gebracht.

Als Impfmaterial dienten in allen Fällen ausgereifte Sporen, die ¼ Minute bei 100° erhitzt worden waren. Als Nährboden wurde, wenn nichts anderes bemerkt ist, Ammon-Agar verwendet. Die Kulturversuche unter verminderter Sauerstoffspannung wurden bei 28°, die unter erhöhter Sauerstoffspannung teils bei 28°, teils bei Zimmertemperatur (i. D. 17°) gemacht.

a) Minimum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Versuch 1. Sauerstoffgehalt: 0 mg Sauerstoff im Liter.

Es trat hier, wie auch in Kontrollversuchen selbst nach 14-tägigem Stehen keine Entwicklung ein; beim Stehen an der Luft trat dagegen nachträglich, wenn auch geschwächt, Sporenkeimung ein und Wachstum. Der sauerstoffreie Raum war dadurch erzielt worden, daß kräftige Kulturen von Bacillus asterosporus mit den zu untersuchenden Kulturen in das Kulturvakuum kamen, das dann möglichst weit ausgepumpt wurde; als Reagens auf Sauerstoff dienten Leuchtbakterien, die vor dem Einstellen in den Kulturapparat deutliches Leuchten gezeigt hatten, nach 1 bis 2 Tagen langer Züchtung unter den angegebenen Verhältnissen durchaus nicht mehr leuchteten.

Versuch 2. Sauerstoffgehalt: 1 mg Sauerstoff im Liter.

Auch hier das gleiche Resultat wie in Versuch 1: Keine Entwicklung bei dieser verminderten, dagegen nachträgliches Wachstum bei der gewöhnlichen Sauerstoffspannung in Luft.

Versuch 3. Sauerstoffgehalt: 4 mg Sauerstoff im Liter.

Ein Belag war nach 10-tägiger Kultur nicht zu entdecken, dagegen wurde vereinzelt Sporenkeimung beobachtet; die Keimstäbchen machten einen stark geschwächten Eindruck.

Versuch 4. Sauerstoffgehalt: 10 mg Sauerstoff im Liter.

Nach 14-tägiger Kultur zeigte sich makroskopisch ein dünner Belag, das Kondenswasser war schwach getrübt. Mikroskopisch waren normale wie geschwächte Stäbchen und vereinzelt auch Sporangien vorhanden.

Versuch 5. Sauerstoffgehalt: 15 mg Sauerstoff im Liter.

Nach zwei Tagen wurde Sporenkeimung beobachtet; die Kulturen zeigten ungefähr dasselbe Bild wie in Versuch 4, nur das Wachstum war etwas kräftiger.

Versuch 6. Sauerstoffgehalt: 20 mg Sauerstoff im Liter.

Nährboden: $^1/_3$ D-Agar + 0,25 Proz. Na_2CO_3.

Nach fünf Tagen war ein schwacher, aber doch deutlicher Belag gebildet, mikroskopisch waren ebenfalls viele normale Oidien und einige Sporenanlagen vorhanden.

Das Minimum der Sauerstoffspannung liegt also bei den angegebenen Nährbedingungen und 28° nach diesen Versuchen für

Sporenkeimung	zwischen	1—4	mg	nahe bei	4	mg	im	Liter
Oidienwachstum	„	4—10	„	„ „	4	„	„	„
Sporenbildung	„	4—10	„	„ „	10	„	„	„

b) Maximum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Versuch 1. Sauerstoffgehalt = 15 Atmosphären O.

Nach 14-tägigem Stehen bei 17° (i. D.) konnte keine Entwicklung beobachtet werden; das nachträglich bei gewöhnlicher Sauerstoffspannung eintretende Wachstum machte einen sehr geschwächten Eindruck.

Versuch 2. Sauerstoffgehalt = 10 Atmosphären O.

In der 14 Tage alten Kultur wurde ganz vereinzelt Sporenkeimung beobachtet, ein Wachstum war aber nicht eingetreten bei dieser erhöhten Sauerstoffspannung.

Versuch 3. Sauerstoffgehalt = 5 Atmosphären O.

Die Kulturen zeigten nach 8-tägiger Züchtung bei 28° folgendes: Das Kondenswasser war nur ganz schwach getrübt, ein Belag kaum zu sehen; Sporenkeimung war vorhanden, auch wurden vereinzelt Schwärmoidien, aber keine Sporen oder Sporenanlagen beobachtet.

Das Maximum der Sauerstoffspannung liegt also demnach bei den angegebenen Bedingungen für

Sporenkeimung	zwischen	10—15	Atmosphären	Sauerstoff
Oidienwachstum	„	5—10	„	„
Sporenbildung	„	1—5	„	„

c) Optimum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Das Optimum wurde nicht bestimmt; die Kulturen wuchsen in Luft sehr gut; die Entwicklung der Kolonien fand am kräftigsten auf der Oberfläche des Substrates statt.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß bei gewöhnlicher Sauerstoffspannung (= 276 mg O im Liter) die günstigsten Bedingungen für die Entwicklung gegeben sind, daß das Optimum der Sauerstoffspannung also sehr wahrscheinlich für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung bei 276 mg O liegt.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Temperaturen von 100° und 80° C.

Die Bestimmung der Sporentötungszeiten bei 100° und 80° C wurde so ausgeführt, wie es im „Praktikum der botanischen Bakterienkunde" (Meyer, 1903. p. 128—131) und auch bei Brede mann (1909. p. 26) angegeben ist.

Als Impfmaterial dienten ausgereifte Sporen normal vorbehandelter Kulturen; als Nährboden Ammon-Agar. Die Kulturen wurden nach der Impfung mit dem abgekochten Sporenmateriale bei 28° gezüchtet.

Die Resultate der Versuche sind aus der kleinen Tabelle zu ersehen. + bedeutet Entwicklung, — keine Entwicklung.

Sporentötungsversuche bei 100° C:

5 Min.	+		10½ Min.	+		13 Min.	—	
6 „	+	+	11 „	—	+	14 „	—	
7 „	+	+	11½ „	+		15 „	—	
8 „	+	+	12 „	—	— +	16 „	—	
9 „	+	+	12½ „	—	—	25 „	—	

Das Maximum der Sporentötungszeit liegt somit bei 100° zwischen 11½ und 12½ Minuten.

Sporentötungsversuche bei 80° C:

1½ Stunden	+		3½ Stunden	+		7 Stunden	+	
2 „	+		5 „	+		9 „	+	+
2½ „	+		5¾ „	+		9¼ „	—	
3 „	+		6 „	+		10 „	—	

Das Maximum der Sporentötungszeit liegt somit zwischen 9 und 9¼ Stunden.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Säuren und Giftlösungen.

Zur Bestimmung der Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Säuren und Giftlösungen wurde ein einfaches Verfahren angewendet, das sich in folgender Ausführung sehr bewährte.

Die gut ausgereiften, mindestens 4 Wochen alten Sporen einer normal vorbehandelten Kultur werden in ½ ccm sterilen Wassers verteilt, sodann in Spitzgläschen (Zentrifugierröhrchen) mit 5 ccm einer Säure oder Giftlösung bestimmter Konzentration versetzt und bei 28° aufbewahrt. In kurzen Zeitabständen, z. B. alle 30, 60 oder mehr Minuten wird die Mischung eine Minute lang umgeschüttelt oder besser nur umgeschwenkt. Nach bestimmten Zeitabständen, wie es die Art der Lösungen und ihre Konzentration bedingen, wird die Mischung bis zur völligen Klärung zentrifugiert, an Stelle der Säure oder Giftlösung, die durch vorsichtiges Aufsaugen mit

der Pipette vom Niederschlage entfernt wird, 5 ccm steriles Leitungswasser zugefügt, nach dem Umschwenken wieder zentrifugiert und dieses Auswaschverfahren so oft — meist genügt fünfmaliges Auswaschen — wiederholt, bis sich auf einfachem chemischem Wege keine wesentlichen Spuren des ursprünglichen Zusatzes mehr nachweisen lassen. Eine Öse des durch das Zentrifugieren gewonnenen Sporenrückstandes überträgt man schließlich auf optimalen Nährboden, züchtet die Kulturen bei optimaler Temperatur und optimalen Sauerstoffbedingungen und verfolgt das Wachstum oder besser noch die Sporenkeimung.

Eine Wachstumshemmung, durch etwa im Sporenmateriale zurückgebliebene Gift- oder Säurereste hervorgerufen, kommt bei dieser Methode, sorgfältige Ausführung vorausgesetzt, kaum in Betracht.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Schwefelsäure.

Konzentration der Schwefelsäure: 16 Proz. ($1 + 5\ H_2O$).

Impfmaterial: Sporen der 25. Kulturgeneration.

Versuch 1. Die Einwirkungsdauer der Schwefelsäure auf die Sporen betrug 20 Minuten bei 28°.

Nach 15 Stunden waren mikroskopisch schon vereinzelte Schwärmoidien und nach weiteren 24 Stunden auch makroskopisch ein deutlicher Belag und mehrere Einzelkolonien vorhanden.

Versuch 2. Die Einwirkungsdauer der Schwefelsäure auf die Sporen betrug 35 Minuten bei 28°.

Keimung, wie Wachstum und Sporenbildung waren etwas verzögert; so waren nach 6 Tagen zwar ein deutlicher Belag und mikroskopisch auch viel Schwärmoidien zu sehen, aber noch keine Sporangien vorhanden. Das Sporenbildungsvermögen war jedoch nicht geschwächt, denn die Kultur zeigte, mehrere Monate später untersucht, einen großen Reichtum an Sporen und Sporangien, auch der Wachstumsbelag auf dem Nährboden war nachträglich noch sehr stark geworden.

Versuch 3. Einwirkungsdauer 50 Minuten bei 28°.

Nach 2 Tagen war eine ganz schwache Trübung des Kondenswassers und nach weiteren 8 Tagen ein schwacher Belag auf dem Ammon-Agar zu beobachten; die Stäbchen machten einen geschwächten Eindruck und enthielten keine Sporen; nach einigen Monaten war der Belag etwas kräftiger geworden, auch waren vereinzelt Sporen gebildet.

Versuch 4. Einwirkungsdauer 105 Minuten bei 28°.

Es trat selbst nach monatelanger Züchtung kein Wachstum ein.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Salzsäure.

Impfmaterial: Sporen der 25. Kulturgeneration.

Versuch 1. Konzentration der Salzsäure 15—16 Proz.

Einwirkungsdauer: 10 Minuten bei 28°.

Nach 15 Stunden waren mikroskopisch Schwärmoidien und nach weiteren 24 Stunden auch makroskopisch ein deutlicher Belag und einige Einzelkolonien zu sehen. Mehrere Monate später untersucht, zeigte die Kultur einen kräftigen Bakterienbelag und mikroskopisch sehr viel Sporen.

Versuch 2. Konzentration der Salzsäure 25 Proz.

Einwirkungsdauer: 40 Minuten bei 28°.

Selbst nach monatelanger Züchtung trat keine Entwicklung auf Ammon-Agar ein.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Zinksulfatlösung.

Konzentration der Lösung: 1 Mol. = 287,4 g in 1000 ccm Wasser.

Impfmaterial: Ausgereifte Sporen der 30. Kulturgeneration.

Versuch 1. Die Einwirkungsdauer der Zinklösung betrug 8 Stunden bei 28°.

Aus den Sporen, auf Ammon-Agar übergeimpft, entstand eine Kultur, die makroskopisch wie mikroskopisch den Eindruck einer geringen Schwächung machte. Zellen dieser 2 Wochen alten Kultur wurden mehrmals hintereinander alle 24 Stunden auf frischen Ammon-Agar übertragen und schon nach drei Übertragungen ein Material erhalten, das sich bezüglich des Wachstums und der Sporenbildung völlig normal verhielt.

Versuch 2. Die Einwirkungsdauer der Zinklösung auf die Sporen betrug 3 Wochen bei Zimmertemperatur (im Durchschnitt 17°).

Nach fünftägiger Kultur auf Ammon-Agar bei 28° war makroskopisch ein deutlich sichtbarer Belag vorhanden, der von dem normalen Bild kaum abwich; auch mikroskopisch war keine sehr deutliche Schwächung vorhanden: es waren allerdings neben normalen Stäbchen, auch dünnere, längere, sowie vereinzelt Fäden vorhanden; reife Sporen wurden erst nach 6 Tagen beobachtet, während sie sonst schon nach 4 Tagen gebildet waren. Die nach Monaten nochmals untersuchte Kultur enthielt aber doch sehr viel Sporen, wenn auch einzelne überraschend klein waren.

Also demnach waren die Sporen selbst nach dreiwöchentlicher Berührung mit nahezu 30 Proz. Zinksulfatlösung nicht wesentlich geschwächt, geschweige denn getötet.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Kaliumdichromatlösung.

Konzentration der Lösung: ½ Mol. = 143 g in 1000 ccm H_2O.

Impfmaterial: Ausgereifte Sporen der 30. Kulturgeneration.

Versuch 1. Die Einwirkungsdauer der Kaliumdichromatlösung dauerte 4 Tage bei 28°.

Eine Schwächung war kaum festzustellen: Sporenkeimung, Wachstum und Sporenbildung waren etwas verzögert, traten aber nachträglich kräftig ein, so daß in der monatealten Kultur fast nur Sporen vorhanden waren.

Versuch 2. Die Einwirkungszeit der Kaliumdichromatlösung betrug 8 Tage bei 28°.

Eine geringe Schwächung zeigte sich bei der aus den Sporen entstandenen Kultur und äußerte sich in Verzögerung des Entwicklungsganges und in der vereinzelten Ausbildung von Fäden, wie der Neigung der Oidien zur Fadenbildung; wurden junge Oidien auf frischen Ammon-Agar übertragen, so zeigt sich völlig normales Wachstum. Die aus den Sporen erwachsene Kultur zeigte nach monatelangem Stehen fast nur Sporen.

Eine 14-proz. Lösung von Kaliumdichromat wirkt demnach selbst nach achttägiger Einwirkung kaum schwächend auf die Sporen von Bacillus probatus.

Widerstandsfähigkeit der Oidien gegen Giftlösungen.

Die Bestimmung der Widerstandsfähigkeit der Oidien gegen Giftlösungen wurde zu dem Zwecke gemacht, ein weiteres differentialdiagnostisches Merkmal für Bakterien zu finden; beobachtet wurde dabei die Wachstums-

hemmung, welche durch das im Nährboden verteilte Gift hervorgerufen wurde.

Als Giftlösungen wurden sterile Lösungen von Zinksulfat 0,1-proz. und Karbolsäure 0,1-proz. angewendet, als Nährboden je 5 ccm Ammon-Agar und als Versuchsmaterial junges, kräftiges Stäbchenmaterial einer 24 Stunden alten, auf Ammon-Agar erwachsenen Kultur. Die Versuchstemperatur betrug wie gewöhnlich 28° C.

Ausführung der Versuche.

1. Versuche mit Zinksulfat: Von der Zinksulfatlösung wurden 1 bis 15 Tropfen je einem Röhrchen mit geschmolzenem Ammon-Agar zugesetzt, so daß in das erste Röhrchen ein, in das zweite zwei, in das dritte drei Tropfen der Zinklösung kamen und so fort. Die Tropfen wurden mit dem im Handel befindlichen Normal-Tropfenzähler nach Kunz-Krause (zu beziehen von Hugershoff, Leipzig, Fig. 1) abgemessen, dessen Abtropffläche so eingerichtet ist, daß 20 Tropfen Wasser von 15° einem Gramm Wasser entsprechen. Statt dieses Normal-Tropfenzählers kann man auch das neuerdings von der Firma Wenderoth, Kassel, empfohlene Normal-Tropfglas (Fig. 2) verwenden. Die Giftlösungen können in diesen Gläschen direkt sterilisiert werden; die zu

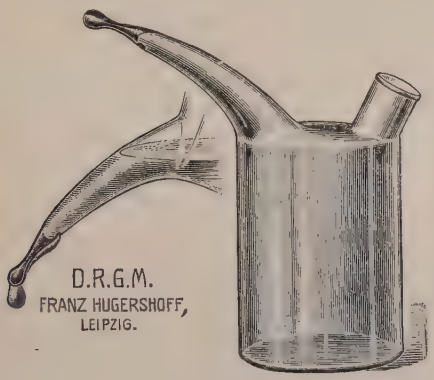


Fig. 1.

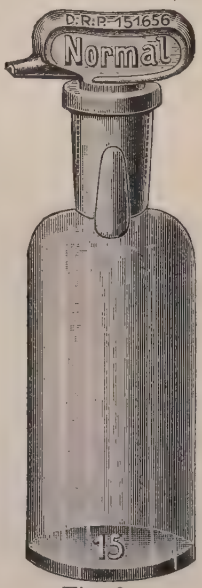


Fig. 2.

erzielenden Tropfen sind gleich groß und schwer und wiegen bei diesen ganz verdünnten wäßrigen Giftlösungen kaum mehr als bei reinem Wasser (= 0,05 g bei 15°). Die mit den Giftlösungen versetzten Agarröhrchen läßt man schräg erkalten.

Resultat: In den mit 10 und mehr Tropfen Zinksulfatlösung versetzten Agarröhrchen war nach Strichüberimpfung des normalen Stäbchenmaterials weder ein makroskopisches, noch ein mikroskopisches Wachstum zu sehen; in dem mit 9 Tropfen versetzten Ammon-Agar war mikroskopisches, in dem mit 8 Tropfen versetzten auch makroskopisch sichtbares Wachstum eingetreten; diese Kulturen machten aber einen stark geschwächten Eindruck, die Stäbchen waren dünn, neigten zur Fadenbildung und enthielten keine Sporen. Bei dem mit 7 Tropfen Zinksulfatlösung versetzten Ammon-Agar konnte noch vereinzelte Sporenbildung neben normalen und geschwächten Stäbchen beobachtet werden. Die mit 1—6 Tropfen versetzten Kulturen zeigten vorwiegend normales Material.

Die Wachstumshemmung erfolgte also in 5 g bei 28° gezüchtetem Ammon-Agarnährboden durch 10 Tropfen, die Hemmung der Sporenbildung durch 8 Tropfen einer 0,1-proz. Zinksulfatlösung. Umgerechnet:

Hemmung des Wachstums auf Ammon-Agar durch 0,01 Proz. Zinksulfat.
„ der Sporenbildung auf Ammon-Agar durch 0,008 Proz. Zinksulfat.

2. Versuche mit Karbolsäure (0,1-proz. sterile Lösung).

In der eben geschilderten Weise wurde auch die Karbolsäurelösung in abgezählten Tropfen den Ammon-Agarröhrchen, je 5 g Nährboden vor der Strichüberimpfung des 24-stündigen Stäbchenmaterials zugesetzt. Selbst auf Zusatz von 30 Tropfen Karbolsäure zu 5 g Ammon-Agar trat noch mikroskopische wie makroskopische Entwicklung ein, Sporenbildung wurde noch beobachtet in der mit 20 Tropfen der 0,1-proz. Karbolsäurelösung versetzten Kultur.

Es erfolgte keine Hemmung des Wachstums auf Ammon-Agar durch 0,03 Proz. C_6H_5OH.

Kapitel 5.

Biochemische Eigenschaften. Stoffwechselprodukte, Enzyme.

(Eiweißabbau.)

Tryptophan = Proteïnochrom.

Bildung: Nach den Untersuchungen von Erdmann und Winternitz (Münchener med. Wochenschr. Bd. 23. 1903. p. 982) und H. Winternitz (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16) sind sehr viele Bakterienspezies zur Tryptophanbildung befähigt. Die Autoren benutzten vorwiegend pathogene Formen; bei den nichtpathogenen Spezies, die in 5-proz. Peptonbouillon gezüchtet worden waren, wurde folgendes festgestellt:

Namen der Spezies	Zeitpunkt des Eintrittes der Reaktion
Bac. acidilactici (?)	—
Bac. megatherium (?)	nach 5 Tagen
Bac. prodigiosus	„ 4 „
Bac. subtilis	„ 3 „
Clostridium (?)	„ 3 „

Als beste Nährlösung wird 5-proz. Peptonnährbouillon empfohlen; auch 3-proz. Peptonwasser mit 0,5 Proz. NaCl soll in den wenigen Fällen, in denen es ein Bakterienwachstum ermöglicht, seiner hellen Eigenfärbung wegen zur Beobachtung der Farbreaktion recht brauchbar sein.

10 ccm der Nährlösung werden mit reichlichen Mengen geimpft, beim Temperaturoptimum aufbewahrt und täglich untersucht.

Nachweis: Die Nährlösung wird mit Essigsäure schwach angesäuert und tropfenweise mit gesättigtem, frisch hergestelltem Chlorwasser versetzt oder besser noch vorsichtig mit diesem überschichtet. Der Eintritt einer rotvioletten Färbung, eines rotvioletten Ringes im Falle der Überschichtung ist beweisend für das Vorhandensein von Tryptophan. Bromwasser ist nach Kruse (1911. p. 540) brauchbar, aber nicht so gut wie Chlorwasser; dieses stellt man am zweckmäßigsten durch Übergießen von Chlorkalkwürfeln mit verdünnter Salzsäure, Einleitung des Chlors in eine Waschflasche mit wenig Wasser und weiter in ein gut schließendes, zu $\frac{2}{3}$ mit ausgekochtem destilliertem Wasser von 10—15° C angefülltes Gefäß bis zur Sättigung.

Variabilität der Tryptophanreaktion.

Es bestehen nach Erdmann und Winternitz (1903) in dem Eintritt der Reaktion kleine Schwankungen, die jedenfalls von der jeweiligen Beschaffenheit der Kultur und den Nährbedingungen abhängen.

5-proz. Peptonbouillon wurde mit Sporen und Stäbchen von Bac. probatus geimpft und in der oben angegebenen Weise auf Tryptophan untersucht. Da jedoch das Wachstum selbst nach wochenlanger Züchtung bei 28° makroskopisch kaum sichtbar war, so fielen die Prüfungen auf Tryptophan negativ aus. In 4 Wochen alter 5-proz. Peptonbouillon, die noch mit 0,2 Proz. Ammonkarbonat versetzt worden war, konnte ebenfalls kein Tryptophan nachgewiesen werden, obwohl hier das Wachstum stärker war. Die Versuche sind also bei Bac. probatus zweckmäßiger mit Peptonbouillon anderer Zusammensetzung, in der die Bakterien besser wachsen, zu wiederholen.

Indol. Bildung und Nachweis.

Die Prüfung auf Indol wurde in 4 Wochen alter 5-proz. Peptonbouillon vorgenommen; das Wachstum der eingeimpften Sporen und Stäbchen war in dieser Nährlösung trotz eines Zusatzes von 0,2 Proz. Ammonkarbonat nicht kräftig.

Diese Bouillon und ihr Destillat wurden nun mit den üblichen (siehe Kruse, 1910, Löhnis, 1910) Indolreagentien auf Indol geprüft.

Es trat jedoch nur bei Anwendung der Ehrlichschen Reaktion ein positives Resultat ein; die hier beobachtete Rotfärbung war zwar deutlich, aber doch nur ganz schwach. Weitere vergleichende Versuche ergaben übereinstimmend mit anderen Angaben (siehe z. B. Telle und Huber, 1911; auch Rochaix et Dufourt, 1910), daß die Reaktion von Ehrlich weitaus die schärfste Reaktion auf Indol ist.

Schwefelwasserstoff. Bildung und Nachweis.

Die Schwefelwasserstoffbildung wurde in 5-proz. Peptonbouillon verfolgt. Am Wattepfropfen war ein mit Bleiessig getränkter Fließpapierstreifen befestigt, der in den Kolben, aber nicht in die Flüssigkeit hineinreichte. Das Wachstum der Bakterien war jedoch in dieser Lösung recht schlecht, eine Schwärzung des Bleipapiers wurde innerhalb 8 Tagen nicht beobachtet. Dagegen trat auf Zusatz von Säure zu 4 Wochen Harnstoffbouillonkultur sofort Schwefelwasserstoffbildung auf; das über das Röhrchen gehaltene feuchte Bleipapier wurde deutlich braunschwarz gefärbt. In gleicher Weise wurde dann auch in 4 Wochen alter, Nährlösung 1 enthaltender Kultur Schwefelwasserstoffbildung nachgewiesen. Der Säurezusatz war nötig, um den Schwefelwasserstoff frei zu machen, der sich mit dem in der Flüssigkeit vorhanden gewesenen Ammoniak zu Schwefelammonium verbunden hatte. (Die Methode des Schwefelwasserstoffnachweises wurde von Petri und Maassen [1893] angegeben.)

Riechstoffe. Trimethylaminbildung.

Die Bildung von Riechstoffen unter bestimmten Nährbedingungen kann bis zu gewissem Grade kennzeichnend sein, zumal bei Feststellung der Art des Riechstoffes, für die Bakterienspezies und ist daher bei der Artbeschreibung zu beachten.

In allen peptonhaltigen Kulturen, besonders aber in Bouillon mit Harnstoff oder Ammoniumkarbonatzusatz trat nach Impfung mit Bac. pro-

batus schon nach einigen Tagen ein unangenehm fauliger Leimgeruch auf, der mit dem Alter der Kultur noch an Stärke zunahm.

Zur näheren Untersuchung des Riechstoffes wurde eine Bouillonkultur, die 5 Proz. Pepton und 0,2 Proz. Ammonkarbonat enthielt und mit Sporen der 40. Kulturgeneration geimpft worden war, nach vierwöchentlicher Züchtung bei 28° benutzt. Diese Kultur zeigte einen starken Geruch nach Heringslake, der weder nach 5 Minuten langem Kochen im Reagensglase, noch auf Zusatz gleicher Mengen 5-proz. Schwefelsäure ganz verschwand. Die Bouillon wurde der Destillation unterworfen und das Destillat, das den bezeichnenden Geruch noch deutlicher zeigte, mit Salzsäure im Überschusse versetzt: der Geruch wurde schwächer, trat aber auf Zusatz von viel Kalilauge wieder deutlich hervor. Geruchsproben, die ich zum Vergleiche noch mit reinem Trimethylamin ausführte, machten die Bildung von Trimethylamin als auffälligen Riechstoff sehr wahrscheinlich.

Für diese Annahme sprechen auch die Versuche von Takeda, auf die mich Herr Prof. Kutscher aufmerksam machte. Takeda (1909. p. 86—88) fand in Übereinstimmung mit einer Notiz in Hoppe-Seylers Handbuch der chemischen Analyse (p. 203), daß bei der ammoniakalischen Gärung des Harns Trimethylamin frei wird. Takeda beschreibt folgende Versuche: „Ich überließ 1 l Menschenharn, in dem sich nach einer Kontrollprobe kein freies Trimethylamin fand, einen Monat der ammoniakalischen Gärung, dann destillierte ich ihn im Vakuum mit Magnesiumoxyd. Das Destillat lieferte mit Goldchlorid eine nicht unbeträchtliche Fällung von Trimethylamingoldchlorid. Die Tatsache, daß bei der ammoniakalischen Gärung Trimethylamin frei wird, ist für die Erklärung des ‚urinösen' Geruchs, den man an faulendem Harn wahrnehmen kann, nicht ohne Wichtigkeit. Es ist zweifellos, daß der ‚urinöse' Geruch durch Ammoniak und andere bisher unbekannte Substanzen bedingt wird. Einer der unbekannten flüchtigen Körper des urinös riechenden Harns ist nunmehr im Trimethylamin gefaßt worden, das nach den Untersuchungen von Kaufmann (1908, Neurolog. Centralbl. No. 6) noch in einer Verdünnung von 1 : 2 000 000 sich der Nase bemerkbar macht."

„Weiter untersuchte ich normalen Hundeharn, den ich einige Tage der ammoniakalischen Gärung überlassen hatte. 1 l davon wurde im Vakuum 20 Minuten mit Magnesiumoxyd destilliert. Ich erhielt aus dem Destillat 0,06 g Trimethylaminaurat. Durch die den Harn zersetzenden Bakterien war also auch hier Trimethylamin in Freiheit gesetzt worden."

Gasbildung.

Der Nachweis der Gasbildung wurde in Gärkölbchen vorgenommen (siehe A. Meyer 1903. p. 104; dort auch Näheres über die Gasbildung in Bakterienkulturen). Es wurden Nährlösungen angesetzt:

a) Mit Kohlehydraten, wie Dextrose, Galaktose, Saccharose und Laktose. Diese sind in den Meyerschen Nährlösungen enthalten, die mit kräftigem Oidienmaterial geimpft und vor der Impfung mit Ammonkarbonat versetzt worden waren. Eine Gasbildung konnte in keinem Falle beobachtet werden.

b) Mit ameisensaurem Natrium (Bildung von Kohlensäure und Wasserstoff). Die Gasbildung: ($CO_2 + H_2$) in Fleischbouillon bei Gegenwart von ameisensaurem Natrium wird von Omelianski als differentialdiagnostisches Merkmal empfohlen (Omelianski 1905. p. 673).

Ich setzte neutraler, 0,1 Proz. Natriumkarbonat-, 0,2 Proz. Ammonkarbonat- und 2 Proz. Harnstoff-haltiger Bouillon 0,5 Proz. ameisensaures Natrium hinzu und impfte dann kräftig; in der neutralen Bouillon trat kein Wachstum ein, dagegen in allen anderen Kulturen; eine Gasbildung fand jedoch nicht statt.

Ammoniakbildung.

1. Ammoniakbildung aus dem Eiweißstoff Pepton:

Nach Marchal (1894) ist die Ammoniakbildung aus stickstoffhaltiger Substanz sehr verbreitet bei den Bakterien; nach Berghaus (1908) hat sie mit dem Wachstumsprozeß selbst nichts zu tun, sie ist vielmehr nach seiner Meinung ein Stoffwechselvorgang. Berghaus hat verschiedene Handelspeptone gefunden, die Ammoniak enthielten, ebenso Fleischextraktstoffe; der von mir untersuchte Fleischextrakt von Liebig enthielt ebenfalls kleine Mengen Ammoniak. Es ist deshalb angebracht, die Versuchslösung vor der Verwendung auf Ammoniak zu untersuchen, ferner während des Versuches die mögliche Verdunstung zu berücksichtigen oder ganz zu verhindern durch geeignete Säurevorlage.

In meinen mit Natriumkarbonat alkalisch gemachten 1 Proz. Pepton enthaltenden Bouillonkulturen konnte ich eine Ammoniakbildung nicht nachweisen. Geprüft wurde mit rotem Lackmuspapier, das am Wattepfropfen der Kulturgläser befestigt war und bis nahe an die Flüssigkeitsoberfläche heranreichte; auch auf Zusatz von Kalkmilch trat keine vorübergehende Blähung des feuchten Lackmuspapieres ein (es wurde einseitiges Postpapier der Helfenberger Fabrik benutzt).

2. Ammoniakbildung aus Nitriten und Nitraten.

Die Ammoniakbildung aus Nitriten und Nitraten durch deren Reduktion ist bekanntermaßen eine bei den Bakterien sehr verbreitete Eigenschaft.

Da ein Wachstum von Bac. probatus selbst in den mit Natriumkarbonat versetzten kaliumnitrat- oder natriumnitrathaltigen Nährlösungen nicht eintrat, führten die diesbezüglichen Versuche zu keinem Resultat. Es wäre möglich, daß in alkalischer Bouillon mit ganz geringem Zusatz eines dieser Salze nach starker Impfung ein Wachstum und damit eine Lösung der Frage zu erzielen wäre.

3. Ammoniakbildung aus Harnstoff:

Das Vermögen des Bac. probatus, den Harnstoff in Ammoniak und Kohlensäure zu spalten, war sehr stark entwickelt, in flüssigen, wie in festen Nährböden. Die Spaltung wurde einmal an dem recht deutlichen Ammoniakgeruch der mit Harnstoff versetzten Kulturen erkannt, weiter auch an den Ausscheidungen von Calciumphosphat und Calciumkarbonatkristallen (siehe Kristallbildung).

Die Versuche zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffspaltungsvermögens sind in einem besonderen Kapitel behandelt; dort finden sich auch die Methoden beschrieben.

Säure- und Alkalibildung.

(Siehe hierzu A. Meyer, 1903. p. 89.)

Die Säure- und Alkalibildungsversuche führten zu keinem Resultat, da in den benutzten neutralen, konstant zusammengesetzten Nährlösungen kein Wachstum stattfand, ebenso nicht in Nährlösung 5, der durch den Titer bestimmte Mengen von Natriumkarbonat zugesetzt waren.

Eine Säurebildung ist vermutlich auf zuckerhaltigen Nährböden, wie Nähragar oder Nährgelatine oder Nährbouillon mit Dextrosezusatz, auf Möhre und Kartoffel vorhanden, da eine deutliche Entwicklung erst auf Zusatz genügender Mengen Alkali stattfindet, das die entstehende Säure sofort wieder abstumpft. Zum Nachweis einer Säurebildung könnte man Agarnährböden mit Kreidezusatz verwenden.

Die Bildung von salpetriger Säure aus Ammoniak ist an anderer Stelle besprochen, ebenso die Bildung von Trimethylamin in peptonhaltigen Kulturen.

Nitrifikation. Oxydation des Ammoniaks zu Nitrit.

Nach den in der Literatur vorliegenden Untersuchungen (die Zusammenstellung siehe bei Löhnis 1910. p. 604 ff.) sind nur die von Winogradsky (1892) isolierten Gattungen Nitrosomonas und Nitrosococcus zur Nitritbildung aus Ammoniak befähigt. Es ist mir nun gelungen, auch für die Harnstoffbakterien diese Fähigkeit nachzuweisen.

Als Reagens auf Nitrit benutzte ich sowohl die Jodzinkstärkelösung als auch vor allem die von Dieudonné (1895), Lunkewicz (1894) und Kläser (noch nicht veröffentl. Marburger Diss.) empfohlene Grieß-Ilosvaysche Probe (Sulfanilsäure + Naphthylamin). Nitritreagens:

Lösung A. Sulfanilsäure 0,5 g, gelöst in Essigsäure (33 Proz.) 150 ccm.
Lösung B. Napthylamin 2,0 unter Erwärmen gelöst in Wasser 20 ccm, darauf versetzt mit Essigsäure (33 Proz.) 150 ccm.

Das Reagens ist in getrennten, luftdicht schließenden, möglichst gefüllten Flaschen aufzubewahren und hält sich dann, wie ich mich durch besondere Versuche überzeugen konnte, unverändert, während es beim Stehen an der Luft schwach bis deutlich rosarot wird. Zur Ausführung der Reaktion gießt man gleiche Teile, etwa je ½ ccm zusammen, erwärmt die Mischung und setzt dann ebensoviel von der auf Nitrit zu prüfenden Flüssigkeit hinzu. Mit diesem Reagens sollen noch 0,0002 mg Nitrit nachweisbar sein; bei sehr geringen Mengen Nitrit tritt eine schwach rötliche Färbung ein, die bei größeren Mengen von Nitrit dann immer stärker rot wird.

Zum Nachweis der Ammoniakoxydation und Nitritbildung benutzte ich sowohl harnstoff- wie ammonkarbonathaltige Lösungen. Eine Zusammenstellung dieser Lösungen, die neben oben genannten Stoffen und mineralischer, stickstoffreier Nährlösung gewöhnlich noch Asparagin und von Kohlenstoffquellen Dextrose oder Rohrzucker und Glyzerin enthielten, findet man auf der Tabelle VI; dort finden sich auch Angaben, mit welcher Stärke die Nitritreaktion in den einzelnen Nährlösungen auftrat. Außer diesen Kulturlösungen, die in Erlenmeyer-Kölbchen mit Watteverschluß angesetzt waren, untersuchte ich auch 2 Proz. Harnstoffbouillon, die in luftdicht verschlossenen Flaschen gezüchtet war. Alle Lösungen waren zu Beginn der Versuche völlig nitrit- und nitratfrei (wie es ja auch nach ihrer Zusammensetzung zu erwarten war). Da sich nach Rullmann (1899) während der mehrwöchigen Aufbewahrungsdauer der Kulturlösungen deutlich nachweisbare Mengen von oxydiertem Stickstoff aus der Laboratoriumsluft in den Kulturlösungen einfinden sollen, wurden auch ungeimpfte Kontrollösungen unter sonst ganz gleichen Bedingungen wie die geimpften Nährlösungen aufbewahrt und am Ende auch mit diesen zum Vergleich auf Nitrit geprüft. Da in meinen Versuchen die Nitritbildung

schon in wenigen Tagen nachweisbar war, erstreckten sich die Versuche nur auf höchstens einige Wochen. Nach dieser kurzen Zeit trat in den ungeimpften Kontrollösungen nur eine schwache rosarote Färbung auf, die kaum stärker war, als diejenige, welche beim Zusammengießen des in nicht gefüllten Flaschen aufbewahrten Reagenzes zu beobachten war. Ein Zutritt von nitrithaltiger Laboratoriumsluft hatte also gar nicht oder in doch nicht deutlich nachweisbarem Maße stattgefunden; zudem war ja in den luftdicht verschlossenen Kulturen mit Harnstoffbouillon ein Zutritt von Laboratoriumsluft ganz ausgeschlossen, eine Täuschung also gar nicht möglich. In 2 Proz. Harnstoffbouillon war schon nach 3 Tagen eine deutliche Reaktion nachzuweisen, die dann bei fortschreitender Kulturentwicklung noch an Stärke zunahm; die Nitritreaktion war aber nach 8 Tagen und selbst nach 4 Wochen nicht ganz so stark, als diejenige, welche in Nährlösungen gleichen Alters, aber anderer Zusammensetzung auftrat; diese enthielten statt 2 Proz. Harnstoff nur 0,2 Proz. Harnstoff oder Ammonkarbonat, neben Asparagin und Dextrose oder Rohrzucker und Glyzerin gelöst in M-Nährlösung. Dieses Resultat überraschte mich, da ich in den Harnstoffbouillonkulturen wegen des zweifellos stärkeren Wachstums auch eine stärkere Nitritbildung erwartet hatte. Es hatte sich nämlich in allen anderen Versuchen herausgestellt, daß bei stärkerer Trübung der Lösung, folglich auch stärkerem Wachstum, eine stärkere Oxydation des Ammoniaks zu Nitrit stattgefunden hatte.

Die erwähnte Tatsache ist anscheinend so zu erklären, daß bei einer für die Nitrifikation günstigen, aber nicht übermäßigen Menge Ammoniak die Nitrifikation am stärksten verläuft.

Schleimbildung.

Schleimbildung konnte bei den Kulturen von Bac. probatus sehr häufig beobachtet werden. Besonders stark war sie in Peptonbouillon, der Harnstoff oder Ammoniumkarbonat zugesetzt worden war. Diese Flüssigkeit war zuweilen nach mehrwöchentlichem Stehen am Boden dickzähflüssig und schleimig fadenziehend; auch in Asparaginlösungen trat nach Zusatz von Harnstoff oder Ammonkarbonat nach längerem Stehen eine deutliche Schleimbildung auf. Auf Ammonagar wurde besonders nach häufigem Überimpfen ein schleimiges Wachstum beobachtet.

Mikrochemisch ließ sich mit Pelikantusche (1 + 1) eine schwache Schleimhülle nachweisen.

Die vermutlich von Schleim herrührende Rotfärbung beim Verrühren jungen Materials von Bac. asterosporus in 50-proz. wäßriger KOH-Lösung (s. A. Viehoever, 1912) blieb beim Einbringen von schleimreichem Stäbchenmaterial des Bac. probatus in KOH-Lösung gleicher Zusammensetzung und Konzentration aus.

Farbstoffbildung.

Eine deutliche Farbstoffbildung konnte nicht beobachtet werden, die auf den Nährböden sichtbaren Bakterienbeläge hatten ein weißlichgraues bis schmutzig-gelbgraues Aussehen.

Fluoreszenz und Lumineszenz.

Fluoreszenz konnte in keinem der festen oder flüssigen Nährböden bemerkt werden.

Leuchtfähigkeit war nicht festzustellen.

Kristallbildung.

Miquel (1904. p. 73) verwendet das Auftreten von Kristallen zur Erkennung und Reinzüchtung von Harnstoffbakterien in Rohkulturen. Er empfiehlt Peptongelatine mit 2—5 Proz. Harnstoff und sagt: „Einige Tage nach Anlegung der Plattenzuchten, oft sogar schon nach 24 Stunden, wird man bemerken, daß die meisten der wahrnehmbaren Kolonien mit einem Hof von hantelförmigen, in Wasser unlöslichen Kristallen umgeben sind, welche aus Karbonaten und Phosphaten des Kalkes aufgebaut und durch das im Nährboden entstandene Ammoniak langsam ausgefällt worden sind. Darum ist dieser Hof auch um so weiter ausgebreitet, je stärker das Spaltvermögen der Bakterien der Kolonie ist. Bisweilen umgibt diese Aureole von Kristallen die kleine Kolonie gleichsam als ein kreisrunder Nebel von einigen Millimetern im Durchmesser; oft aber ist die ganze Gelatineschicht binnen 24 Stunden mit solchen Kriställchen übersät. An diesem Verhalten können die Kolonien harnstoffvergärender Arten auf der Platte als solche erkannt und ohne weiteres Suchen in neuen Nährboden übertragen werden, in welchem sie dann auf ihre vermutete Fähigkeit zu prüfen sind."

Beijerinck (1901) hebt dagegen hervor, daß die Heranziehung der Kristallbildung als Erkennungsmittel für Harnstoffbakterien wenig geeignet sei, da die Abscheidung der Kristalle erst nach vielen Stunden und auch sehr unregelmäßig erfolge, weil sie von den in der Kulturgelatine gegenwärtigen Substanzen und von anderen oft unbekannten Nebenbedingungen abhängig sei.

Löhnis (1905, 1910), der seinen Kulturen statt 2 Proz. nur 1,5 Proz. Harnstoff zusetzte, erwähnt ebenfalls die Unsicherheit der Kristallbildung.

Ich fand in Nährböden mit 0,2 Proz. Harnstoff gewöhnlich nur bei mikroskopischer Betrachtung Kristalle, bei makroskopischer Betrachtung waren sie nur selten zu bemerken. Aber alle festen und flüssigen Nährböden mit 2 und mehr Proz. Harnstoff ließen, mit Harnstoffbakterien geimpft, auch äußerlich bei kräftigem Wachstum meist schon nach 24 Stunden die Kristallbildung erkennen; diese war allerdings in dem einen Falle deutlicher als in dem anderen, bei der Durchsicht des Nährbodens event. mit Hilfe der Lupe oder des Binokulars waren sie aber immer aufzufinden. Auf festen Nährböden werden entweder größere Kristalle ausgebildet, die im Nährboden, vorwiegend aber an seiner Oberfläche, unregelmäßig verteilt sind, oder es entsteht ein ganz feiner Kristallniederschlag, welcher der Nährbodenoberfläche bei der Durchsicht ein trübes wolken- oder milchglasähnliches Aussehen gibt. Natürlich können auch beide Erscheinungen der Kristallbildung gleichzeitig nebeneinander vorkommen. In den harnstoffhaltigen Flüssigkeiten sieht man zuerst beim Umschwenken einzelne kleine längliche Kristalle aufleuchten, die mit fortschreitender Kulturentwicklung in größerer Menge entstehen und sich dann an die Glaswand oder an den Gefäßboden festsetzen und zum größeren Teile beim Ausgießen der Kulturlösung als in Wasser unlösliche Kristalle zurückbleiben. Die von stärker harnstoffhaltigen Nährböden entnommenen Bakterienbeläge enthielten mikroskopisch betrachtet eine Unmenge von vorwiegend hantelförmigen Kristallen verschiedener Größe. Die Kristalle bestehen, wie schon an anderer Stelle hervorgehoben wurde und wie auch Söhngen (1909) feststellte vorwiegend aus Calciumkarbonat und Calciumphosphat.

Da die Entstehung der Kristalle abhängig ist von der Bildung des Ammoniaks in stärker harnstoffhaltigen Kulturen, so kann die Kristallbildung

recht wohl als Erkennungsmerkmal für Harnstoffbakterien mit herangezogen werden.

Iriserscheinung.

Die von Beijerinck zur Erkennung von Harnstoffbakterien in Rohkulturen empfohlene Beobachtung der Iriserscheinung beruht gleichfalls auf einer Ausscheidung von Kristallen durch das im Nährboden infolge der Bakterientätigkeit freigemachte Ammoniak. Nach Beijerinck (1901) impft man die fraglichen Bakterien auf eine 2 Proz. Harnstoff enthaltende Hefewassergelatine (s. unten) über und kann dann, wenn Harnstoffbakterien zugegen sind, schon in wenigen Minuten bei den ammoniakbildenden Kolonien die Iriserscheinung beobachten; und es entsteht ein völlig amorpher Niederschlag, der sich zunächst nur ausschließlich in der Gelatineoberfläche ablagert, und zwar in so dünner Schicht, daß darin Newtonsche Farbenringe sehr schön sichtbar werden; nach einiger Zeit entsteht auch in der Tiefe der Gelatine ein amorpher, weißer Niederschlag, der infolge der Bildungsweise die Form einer plankonvexen Linse annimmt, wobei die Farbenpracht nicht verloren geht. Die Ausdehnungsschnelligkeit steht in direktem Zusammenhange mit der Intensität der Ureumspaltung, also mit der Aktivität des untersuchten Bakterienmaterials". Die Entstehung der Iriserscheinung ist nach den neueren Untersuchungen von Söhngen (1909) auf die Bildung eines sehr feinen Calciumphosphatniederschlages zurückzuführen.

Ich habe zwei Versuchsreihen mit Harnstoff-Hefewassergelatine gemacht und dabei auch den erwähnten Kristallniederschlag beobachten können, dagegen nicht immer die Farbenringe; ein Ausbleiben der Farbenringe ist also nicht beweisend für die Abwesenheit von Harnstoffbakterien und die „Iriserscheinung" somit von untergeordneter Bedeutung für die Speziesdiagnose.

Protease-Bildung = Gelatineverflüssigungsvermögen.

Zur Feststellung des Gelatineverflüssigungsvermögens und der Variation der Gelatineverflüssigung wurden folgende Nährböden hergestellt:

1. Hefewassergelatine (nach Beijerinck, 1911) + 2 Proz. Harnstoff. Hefewassergelatine ist Gelatine + ein mit 20 Proz. Preßhefe bei 100° hergestellter wässeriger Auszug.
2. D-Gelatine (Nährstoffkonzentration wie D-Agar) + 2 Proz. Harnstoff.
3. Nährgelatine (ohne Dextrose) + 0,1 Proz. Na_2CO_3.
4. Nährgelatine (ohne Dextrose) + 2 Proz. Harnstoff + 0,3 Proz. Ammonkarbonat.
5. ⅓ D-Gelatine (Nährstoffkonzentration wie ⅓ D-Agar) + 0,2 Proz. Ammoniumkarbonat.

Die Nährböden enthielten alle 10 Proz. Gelatine.

Alle Kulturen wurden bei Zimmertemperatur (17° C i. D.) aufbewahrt.

1. Versuch. Nährboden: Harnstoff-Hefewassergelatine.

Impfmaterial: ¼ Minute bei 100° abgekochte Sporen von Harnst. mineralag. Am 1. 3. 1909 wurden die Hefewassergelatineplatten geimpft, am 10. 3. 1909 untersucht. Eine Verflüssigung der Gelatine war nicht eingetreten.

2. Versuch. Nährboden: D-Gelatine + 2 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: 6 Wochen alte, bei 100° abgekochte Sporen einer Harnstoffmineralagarkultur.

a) Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht am 28. 4. 1909 ist nach 24 Stunden deutlich sichtbar und am 12. 5. 1909, also nach 14 Tagen, 4—5 cm tief entwickelt. Eine Verflüssigung der Gelatine wurde nicht beobachtet.

b) Strich auf ein schräg erstarrtes Gelatineröhrchen am 28. 4. 1909, nach 24 Stunden deutlich entwickelt und etwas rhizoidenartig in die Gelatine gewachsen; eine Verflüssigung trat auch nach 14 Tagen nicht ein.

3. Versuch. Nährboden: Nährgelatine + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Impfmaterial: 24-stündige Oidien einer ⅓ D-Agar + 0,1-proz. Na_2CO_3-Kultur.

Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht am 15. 9. 1910 ist nach 24 Stunden 2 cm tief, nach 6 Tagen, am 21. 9. 1910, 6 cm tief vorgedrungen, die Gelatine aber ist nicht verflüssigt.

4. Versuch. Nährboden: Nährgelatine + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Impfmaterial: 24-stündiges, auf Ammon-Agar gewachsenes Oidienmaterial.

Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht am 8. 2. 1911 ist nach nahezu 3 Wochen bis auf den Boden vorgedrungen unter Ausbildung sternförmig vom Stich sich verzweigender Kolonien. Verflüssigung hatte nicht stattgefunden.

5. Versuch. Harnstoff-Hefewassergelatine.

Impfmaterial: 24-stündiges, auf Ammon-Agar gewachsenes Oidienmaterial.

Das am 5. 10. 1911 auf die Gelatineplatte durch Strich übertragene Bakterienmaterial zeigte nach 11 Tagen, am 16. 10., deutliche, wenn auch schwache, Verflüssigung.

6. Versuch. Nährboden: Nährgelatine + 2 Proz. Harnstoff + 0,3 Proz. Ammoniumkarbonat.

Impfmaterial: 24-stündiges, auf Ammon-Agar gewachsenes Oidienmaterial.

a) Der Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht vom 5. 10. 1911 war am 16. 10. 1911 4 cm tief vorgedrungen, zeigte auf der Oberfläche einen schwachen Belag und im Innern einen rübenförmigen, wolkigen oder schleierartigen Wuchs. Eine Verflüssigung wurde nicht beobachtet, auch nach weiteren 5 Tagen nicht. Am 6. 11. 1911 war dagegen die Gelatine erweicht an der Oberfläche, zeigte eine trichterförmige Einsenkung, in deren Boden sich etwa 0,2 ccm verflüssigte Gelatine angesammelt hatte. Bei der Durchsicht waren Kristalle im Nährboden sichtbar.

b) Strich auf ein schräg erstarrtes Gelatineröhrchen am 5. 10. 1911 gemacht und am 23. 10. 1911 untersucht. Der Strich war 6 mm breit, grauweißlich, durchscheinend opaleszierend. Es war nur ganz schwaches Wachstum in den Nährböden vorhanden. Kristallausscheidung hatte stattgefunden, war aber nicht sehr deutlich sichtbar. Eine Verflüssigung der Gelatine wurde nicht festgestellt, diese zeigte nur schwache Erweichung und war etwas zusammengerutscht.

Nach weiteren 14 Tagen, am 6. 11. 1911, war etwa 1 ccm Gelatine verflüssigt.

7. Versuch. Nährboden: ⅓ D-Gelatine + 0,2 Proz. Ammonkarbonat. Ausführlich beschrieben p. 38.

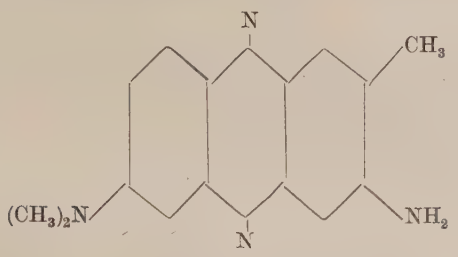
Es geht aus meinen Versuchen hervor, daß erst nach 2-jähriger Fortzüchtung der Bakterien auf künstlichen Nährböden eine schwache Gelatineverflüssigung beobachtet werden konnte, daß das Gelatineverflüssigungsvermögen dann bei weiter fortdauernder Kultur, nach 3 Jahren, noch stärker wurde. Bei Kulturen mit schräg erstarrter Gelatine war der Eintritt der Verflüssigung früher zu bemerken und diese bei meinen Beobachtungen etwa doppelt so stark, als in den Stichkulturen mit 8 cm hoher Gelatineschicht. In dem letzten Versuche (Versuch 7) benutzte ich Ammon-Gelatine (Nährstoffkonzentration = Ammon-Agar) und konnte in den Gelatinestichkulturen nach 5—6 Tagen einen kleinen Verflüssigungstrichter, nach zwei Wochen ungefähr einen Kubikzentimeter verflüssigte Gelatine feststellen. Nach insgesamt 8 Wochen waren 2—3 ccm Gelatine verflüssigt, während in den Strichkulturen mit schräg erstarrter Gelatine in der nämlichen Zeit gegen 4 ccm Gelatine verflüssigt waren.

Während Behrens (1896), Gottheil (1901) und andere Autoren (s. Fuhrmann, 1907) bei Formen, die anfangs Gelatine verflüssigten, nach längerer Fortzüchtung auf künstlichen Nährböden einen Verlust des Gelatineverflüssigungsvermögens beobachten konnten, liegt hier der umgekehrte Fall vor, daß nämlich diese Fähigkeit erst nach längerer Fortzüchtung auftrat. Dabei ist allerdings zu beachten, daß ich bemüht war, eine Stärkung des Wachstums auf künstlichen Nährböden zu erreichen.

Reduktion von Neutralrot (Reduktase).

Neutralrot ist nach den Farbstofftabellen von Schultz und Julius (1897. p. 176) ein wohl charakterisierter Farbstoff. Neutralrot, auch Toluylenrot genannt, ist eine Azinfarbe und hat folgende Zusammensetzung:

Dimethylamidotoluphazinchlorhydrat:



Eigenschaften:

In Wasser leicht löslich mit karmesinroter Farbe, in Alkohol leicht löslich mit fuchsinroter Farbe und schwach rotbrauner Fluoreszenz.

Mit Salzsäure färbt sich Neutralrot blau, im Überschuß reinblau.

Mit Schwefelsäure grün, auf Zusatz von Wasser dann zuerst blau, dann fuchsinrot.

Natronlauge bildet in Neutralrotlösungen einen gelbbraunen Niederschlag, die alkoholische und ätherische Lösung fluoresziert stark.

Bezugsquelle: Dr. G. Grübler u. Co., Leipzig.

Neutralrot wurde zuerst von Rothberger (1898) zur Differentialdiagnose empfohlen; während Typhusbakterien die Farbe von Neutralrot nicht verändern, kann man bei typhusähnlichen und anderen Bakterien eine deutliche Veränderung, zuweilen bis zur völligen Entfärbung des Farbstoffes gehend beobachten und benutzt deshalb Neutralrotagar zur Unterscheidung der Typhusbakterien von typhusähnlichen (siehe Abel, 1910. p. 72). Rochaix und Dufourt (1910) empfehlen, meines Erachtens dabei viel zu weitgehend, Neutralrot zur Unterscheidung von harnstoffspaltenden und nicht harnstoffspaltenden Bakterien; jene, wozu die Forscher nach Hallé und Dissart (1893) auch die Colibakterien rechnen, verändern den Farbstoff in auffälliger Weise.

Der von Abel (1910. p. 72) zur Differentialdiagnose empfohlene Neutralrotagar ist folgendermaßen zusammengesetzt:

100,0 g Nähragar mit 0,3—0,75 Proz. Agar

0,3—0,5 Proz. Dextrose

1,0 g einer kaltgesättigten, wäßrigen, im Dampf sterilisierten Neutralrotlösung.

Nach Rothenberger (1898) setzt man 1—2 Tropfen einer 2-proz. wäßrigen Neutralrotlösung zu einem Röhrchen Nähragar, der dadurch dunkelrot gefärbt wird.

Rothenberger arbeitete mit „Schüttelkulturen“, d. h. er verteilte das Impfmaterial in dem noch flüssigen Agar durch Schütteln; Wolff und Scheffler empfehlen dagegen „Stichkulturen“, sie bringen das Impfmaterial durch einen Stich in den erstarrten Agar; die Farbveränderung geht dann vom Stich aus und ist deutlicher zu sehen.

Ich wandte ebenfalls Stichkulturen an und zwar nahm ich Ammon-Agar, dem auf je 5 ccm nach den Angaben von Rothenberger in dem

einen Versuche ein und in dem 2. Versuche 2 Tropfen einer 2-proz. wäßrigen Neutralrotlösung zugesetzt worden waren.

Versuch 1: Ammon-Agar mit 1 Tropfen Neutrallösung zeigt bei durchscheinendem Licht eine orangerote Färbung ohne Fluoreszenz, bei auffallendem Licht eine nahezu burgunderrote Färbung mit deutlicher, schwach rötlicher Fluoreszenz.

In dem geimpften Agar trat schon nach 3 Tagen ein deutlicher Umschlag in gelb ein. Die nach 2 Wochen beobachtete Kultur zeigte folgendes Bild:

Makroskopisch. Durchscheinendes Licht:

Der Stich ist wolkig getrübt und zeigt rübenförmiges Wachstum; der Agar ist dunkelgelb gefärbt ohne Fluoreszenz.

Auffallendes Licht: Auf der Agaroberfläche ist ein zusammenhängender, etwas erhabener, gelblicher bis schwach rötlicher Belag, der Agar ist schmutzig- bis bräunlichgelb verfärbt.

Mikroskopisch. Die Kultur macht einen geschwächten Eindruck, die Stäbchen zeigen Neigung zur Fadenbildung, sind vorwiegend dünner und länger (Dicke 0,7, Länge 5 μ durchschnittlich) als im normalen Zustand. Sporen sind vorhanden, jedoch nicht sehr viele.

Versuch 2. Ammon-Agar mit 2 Tropfen Neutralrotlösung ist deutlicher rot gefärbt und zeigt auch nach der Impfung und längerem Wachsen der Bakterien einen rötlichen Schimmer. Die Kultur verhält sich makroskopisch und mikroskopisch genau wie die in Versuch 1 beschriebene; d. h. mikroskopisch war das Wachstum und das Sporenbildungsvermögen noch mehr geschwächt.

In den geimpften Kulturen trat eine Ausscheidung von blutroten Kristallnadeln ein, die ungeimpften Kulturen blieben völlig unverändert. Das Reduktionsvermögen des B. probatus ist somit erwiesen.

Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd unter Bildung von Sauerstoff (Katalase).

Die Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd durch Bakterienkulturen ist sehr häufig beobachtet worden (Lit. s. Oppenheimer, 1909. p. 398, oder vollständiger bei Kruse, 1910. p. 471). Ich verwendete zu meinen Versuchen 3-proz. und 30-proz. Wasserstoffsuperoxyd, auf dessen Zusatz ich in allen flüssigen Kulturen, in denen Wachstum eingetreten war, eine kräftige Schaumbildung unter Sauerstoffentwicklung beobachten konnte. Die ungeimpften Nährlösungen zersetzten Wasserstoffsuperoxyd nicht im geringsten.

Oxydase und Peroxydase.

Über das Vorkommen von Oxydasen bei Bakterien habe ich in der Literatur nichts finden können.

Zum Nachweis der Peroxydase versetzte ich 4 Wochen alte, ammoniumkarbonathaltige Bouillonkulturen mit 1-proz. wäßrigem Guajakol und wenigen Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (Kobert, 1903). Eine Färbung konnte nicht beobachtet werden; zum Vergleich wurde ein wäßriger Brei gekeimter Erbsen herangezogen, der auf Zusatz des Kobertschen Reagenzes sofort braunrot gefärbt wurde.

Die Versuche müßten mit jüngeren Bouillonkulturen wiederholt werden.

Diastase = Amylase.

Zum Nachweis einer Diastasebildung habe ich die Methoden von A. Meyer (s. Gottheil, 1901. p. 463) und die von Beijerinck (1899. p. 367; s. auch Vahle, 1909. p. 56) benutzt.

Weder die in Stärkebouillon noch die auf alkalischem ⅓ D-Agar gewachsenen Bakterien erzeugten Diastase.

Urease.

Musculus (1874. p. 132; 1876. p. 214) fand zuerst in schleimigem, ammoniakalischem Harn ein Enzym mit harnstoffspaltender Wirkung. Diese Beobachtung wurde dann später von Pasteur und Joubert (1876. p. 5), Lea (1886. p. 136; 1890. p. 226), Miquel (1890) und anderen Forschern bestätigt und ihre Entstehung auf die Fähigkeit von harnstoffspaltenden Bakterien zurückgeführt.

Auch bei Pilzen wurde Urease gefunden (s. Kikkoji, 1909. p. 80) oder doch ihr Vorkommen recht wahrscheinlich gemacht durch das Wachsen mehrerer Pilze in harnstoffhaltigen Flüssigkeiten, wobei Ammoniak abgespalten wurde (s. Miquel, 1878, 1879, 1882; Semal, 1898. p. 279; 1899. p. 205 und besonders Kossowicz, 1912 a. p. 60; 1912 b. p. 36). Takeuchi (1909) fand sogar in Samen und Keimlingen der Sojabohne (Soja hispida) reichliche Mengen eines harnstoffspaltenden Enzyms, eine Beobachtung, die ich nach Anstellung einiger Versuche bestätigen kann.

Musculus (l. c.), Lea (l. c.), Beijerinck (1901. p. 55) und Moll (1902. p. 344) gewannen das Enzym durch Fällen des ammoniakalischen Harnes mit Alkohol.

Miquel (1904. p. 82; 1898; 1890. p. 397) versetzte Peptonbouillon mit Ammonkarbonat oder meist mit 0,2—0,3 Proz. Harnstoff, impfte mit gärkräftigen Harnstoffbakterien und züchtete bei 30—35° unter Durchleitung eines schwachen Luftstromes zur Anregung der Zellvermehrung.

Wurden mehrere Liter dieser Bouillon einige Tage nach der Impfung durch Porzellanfilter — möglichst bei Abschluß der Luft — filtriert, so behielt das Filtrat nahezu die gleiche harnstoffspaltende Wirkung. Auch nach den Angaben von Pasteur und Joubert (1876) ist das Enzym filtrierbar.

Die Ansichten über die Weise, in welcher das Enzym tätig ist, gehen auseinander: Musculus und vor allem Miquel sind der Ansicht, daß das Enzym aus der lebenden Zelle in die Nährflüssigkeit heraustrete, also ein Ektoenzym sei. Leube (1885) bestreitet dies, er hält vielmehr die Harnstoffspaltung für eine spezifische Lebensäußerung der Harnstoffbakterien. Lea (1890) meint dagegen, daß die Urease als Endoenzym an die lebende Zelle gebunden sei, bei deren Abtöten, er benutzte dazu Alkohol, aber frei und löslich werde. Beijerinck (1901) und Moll (1902) halten die Urease ebenfalls für ein Endoenzym. Beijerinck (p. 57) kommt auf Grund seiner Versuche zu der Überzeugung: „Die Urease ist ein unlösliches Enzym, welches sowohl an dem lebenden, wie dem toten Bakterienkörper festgebunden ist.“ Er machte folgende Versuche mit Micrococcus ureae: Er filtrierte die ureasehaltige Kulturlösung durch Fließpapier, brachte das Filtrat wie den Filterrückstand getrennt mit Harnstofflösung in Berührung und beobachtete dann das weit größere Spaltungsvermögen des Filterrückstandes. Diese Versuche wurden bei 50°, einer für die Kokken tödlichen, für das Enzym nur wenig schädlichen Temperatur vor-

genommen; in anderen Versuchen, die zu dem nämlichen Resultate führten, waren die Kokken mit Chloroform abgetötet worden. In seinen Diffusionsversuchen prüfte er mit lebenden und toten Bakterien durch Striche geimpfte Kulturplatten nach wochen- bis monatelangem Stehen mittels der Iriserscheinung auf etwa in den Nährboden diffundiertes Enzym, konnte aber niemals Farbenringe beobachten. Dieses Ausbleiben der Iriserscheinung ist jedoch, wie oben schon hervorgehoben wurde, nicht beweisend für die Abwesenheit der Harnstoffbakterien oder deren Enzym, weil sie nicht immer auftritt. Die anderen Versuche Beijerincks sprechen für seine Ansicht, ohne diese allerdings ganz sicherzustellen. Exakte Filtrationsversuche mit Bakterienfiltern hat Beijerinck selbst nicht gemacht, er stützt sich auf die Angaben Leubes (1885), der kein Enzym in der durch eine Kerze filtrierten Urokokkenkultur erhalten konnte.

Die abweichenden Resultate der Forscher Musculus und Miquel führt Beijerinck darauf zurück, daß in den vermeintlichen Enzymlösungen nicht bemerkte ureasebildende Keime vorhanden waren, die bei Miquel wahrscheinlich durch Verwendung fehlerhafter Filterkerzen in das Filtrat hatten gelangen können.

Beachtenswert scheint mir die von Kruse (1910. p. 597) ausgesprochene Meinung, daß sich die Widersprüche in den Resultaten vielleicht auch durch die Verschiedenheit der benutzten Bakterien erklären lassen. Leube wie Beijerinck verwendeten zu ihren Enzymgewinnungsversuchen „Urokokken", Miquel nahm seine gärkräftigsten stäbchenförmigen „Urobazillen". Im Hinblick auf die Gewinnung von Antiurease durch Moll sagt Kruse (p. 598): „Vielleicht könnte man mit Hilfe der Antiurease Unterschiede der einzelnen Ureasen nachweisen."

Meines Erachtens müßte man die Frage, ob die Urease ein Ekto- oder ein Endoenzym ist, und ob dieses auch an den toten Zellkörper gebunden ist oder nicht, in folgender Weise entscheiden können: Größere Mengen ureasehaltiger Bouillon müßten möglichst bei Sauerstoffabschluß, am besten vielleicht in einer Kohlensäure- oder Ammoniakatmosphäre durch fehlerfreie Filterkerzen filtriert werden; ein Teil des steril aufgefangenen Filtrates wäre direkt mit Harnstofflösung zu versetzen, könnte auch mikroskopisch bei schwacher Vergrößerung in der Zählkammer auf Bakterien untersucht werden; ein anderer Teil des Filtrates wäre zu zentrifugieren und der Bodensatz mikroskopisch zu untersuchen; der dritte Teil wäre mit Alkohol zu versetzen, zu zentrifugieren und das Abgeschleuderte sowohl auf etwa vorhandene Bakterien wie mit Harnstofflösung auf Spaltungsvermögen zu untersuchen. Wenn sich hierbei ein Spaltungsvermögen des Filtrates bei völliger Abwesenheit von Bakterien herausstellte, so wäre damit das Vorhandensein eines Ektoenzyms sicher bewiesen. Würde man, wenn kein Enzym gefunden worden wäre, dann nach Beijerincks Vorgang die in der ursprünglichen Kulturflüssigkeit enthaltenen Bakterien durch Erwärmen auf 50° zum Absterben bringen und dann in der genannten Weise filtrieren und weiter untersuchen, so könnte man schließlich bestimmt entscheiden, ob das Enzym beim Abtöten der Zellen aus diesen heraustritt oder nicht.

Bezüglich des Temperatureinflusses auf Urease ist folgendes zu bemerken: Nach Miquel (1904. p. 82) liegt das Optimum der Ureasewirkung bei 48—50°, das Maximum in der Nähe von 80° (1 Minute bei 80° tötet), das Minimum unterhalb 0°; bei —5° ist nach mehren Tagen eine merkliche Schwächung vorhanden.

Gegen die gebräuchlichen Giftlösungen und Lösungsmittel wie Äther, Alkohol, auch Chloroform und Toluol, gegen Säuren und Alkalien ist das Enzym sehr empfindlich; Fluornatrium zerstört es weniger leicht (s. Miquel [1904] und Moll).

Gegen Sauerstoff ist die Urease nach Miquel (1904. p. 82) sehr empfindlich, kaum oder nicht empfindlich gegen andere Gase wie Leuchtgas. Nach Ladureau (1884. p. 877; s. auch Oppenheimer, 1909) bleibt das Enzym im luftleeren Raum, und wenn Stickstoff, Wasserstoff oder Kohlensäure zugegen sind, selbst bei 3 Atmosphären wirksam.

Bezüglich der Einwirkung von Rohrzucker und Glyzerin sagt Miquel (1904. p. 82): „Einige Stoffe, wie Saccharose und Glyzerin, vermögen die Wirkungskraft der Urease zu verdoppeln und zu verdreifachen, vielleicht dadurch, daß sie das Enzym vor dem zu starken Angriff jener Temperatur schützen, welche die Hydrolyse am meisten begünstigt.“ Ich vermute dagegen, daß diese Stoffe die Zellvermehrung begünstigen und damit auch die größere Harnstoffspaltung zeitigen.

Hierher gehören wohl auch die Beobachtungen von Machida (1907. p. 1; siehe auch Kossowicz, 1912. p. 38), daß Magnesiumsalze, besonders Magnesiumchlorid, die Harnstoffzersetzung befördern; er bestätigt damit die Untersuchungen von Burchard (1899), der seiner Kulturlösung — er benutzte unverdünnten Harn — Magnesiumphosphat und in einem anderen Falle Gips zusetzte und besonders nach Magnesiumphosphatzusatz eine größere Harnstoffspaltung beobachten konnte; Burchard erklärt sich die Wirkung seiner Zusätze so, daß sie möglicherweise gute Nährsalze, möglicherweise auch Reizmittel für die Harnstoffspaltung seien.

Um diese Fragen zu klären, müßten Harnstoffspaltungsversuche mit bestimmt und gleich zusammengesetzten Nährlösungen ohne und mit Zusatz der genannten Stoffe, wie Magnesiumsalze, unter gleichzeitiger Festlegung der Vermehrungsgröße (siehe Keimzählung) gemacht werden.

Kapitel 6.

Tierversuche: Pathogenität und Giftbildung.

Pathogenität.

Die Feststellung der Bakterienwirkung im Tierkörper ist in der Bakterienforschung ein wichtiges, ja in vielen Fällen bis jetzt unentbehrliches Hilfsmittel zur Erkennung der Bakterienart geworden.

Ausführung des Versuches: Als Versuchstier wurde ein gesundes, sechs Wochen altes, nicht vorbehandeltes Meerschweinchen benutzt; in die Bauchhöhle dieses Tieres wurde 1 ccm einer nahezu neutralen Aufschwemmung des Bakterienrasens einer 24 Stunden alten Ammon-Agarkultur in destillierten sterilen Wasser eingespritzt.

Der Einfluß der Einspritzung auf die Körperwärme des Tieres ist aus der Tabelle zu ersehen; die Temperaturmessungen wurden vorgenommen mittels eines in den After des Tieres eingeführten Maximalthermometers mit kleinem Hg-Gefäß.

Resultat des Tierversuches: Außer einem geringen Ansteigen der Körpertemperatur (siehe die Tabelle VIII) und einem schwachen Haarausfall konnten keine Folgeerscheinungen beobachtet werden: Das Versuchstier war nach 8 Tagen wieder völlig munter.

Tabelle VIII.

	Zeit der Messung	Temperatur
Meerschweinchen vor der Impfung	8. 11. 10^{30}	36,6°
„ nach „ „	8. 11. 10^{50}	
„ „ „ „	8. 11. 11^{30}	36,75°
„ „ „ „	8. 11. 1^{00}	36,9°
„ „ „ „	8. 11. 6^{00}	37,3°
„ „ „ „	8. 11. 10^{45}	37,5°
„ „ „ „	9. 11. 12^{30}	36,5°
„ „ „ „	9. 11. 6^{30}	37,6°
„ „ „ „	9. 11. 8^{00}	38,1°
„ „ „ „	10. 11. 11^{15}	37,4°
„ „ „ „	10. 11. 1^{00}	37,2°
„ „ „ „	10. 11. 5^{45}	37,6°
„ „ „ „	10. 11. 7^{30}	37,9°
„ „ „ „	13. 11. 6^{45}	37,7°
„ „ „ „	14. 11. 12^{15}	36,4°
„ „ „ „	15. 11. 1^{00}	37,2°

Giftbildung.

Zum Nachweise der Giftbildung beobachtete ich die Änderung des Blutdruckes und der Atemkurve der Versuchstiere, einem Kaninchen und einer Katze, in deren Blutbahn ein Teil der flüssigen Bakterienkultur luftfrei eingespritzt worden war. Zur Aufzeichnung des Blutungsdruckes und der Atemkurve wurde ein Registrierapparat (Kymographion) benutzt.

Als Impfmaterial fand eine 3 Tage alte, aus kräftigen Schwärmoidien bestehende Bouillonkultur Verwendung, je 1 ccm davon wurde den Tieren in die geöffnete Halsschlagader eingespritzt.

Die nach der Einspritzung beobachteten Kurven zeigten nur ganz unwesentliche Störungen; kleine Abweichungen waren vorhanden, wurden aber in Kontrollversuchen auch durch ungeimpfte Bouillon hervorgerufen.

Eine durch die Bakterien erzeugte Bildung von Giftstoffen konnte also nicht beobachtet werden.

Kapitel 7.

Allgemeines und Methodisches über Harnstoffspaltung.

Allgemeines.

Wie wir eingangs gesehen haben, wird der Harnstoff in Ammoniak und Kohlensäure gespalten; es ist bemerkenswert, daß hier ein Organismus dieselben Spaltungsprodukte aus Harnstoff erzeugt, die wir auch bei der Hydrolyse des Harnstoffs durch Einwirkung von Säuren und Alkalien — besonders in der Wärme — auftreten sehen:

$$CO(NH_2)_2 + 2\ H_2O = CO_3(NH_4)_2.$$

Wird auch, wie Czapek (1905) meint, relativ wenig Energie bei der Harnstoffgärung frei, so hat doch die Größe des sehr bedeutenden Umsatzes die geringe Ergiebigkeit des Vorganges auszugleichen; „. . .`. es liegt ein ungemein wichtiges ökologisches Moment in der Bedeutung der Harnstoffspaltung als Energiequelle".

Es ist jedoch recht unwahrscheinlich, daß der Harnstoff als Energiequelle dient: das Wachstum in harnstoffhaltigen ist nicht so gut als in ammo-

niumkarbonathaltigen, aber harnstoffreien Nährböden (siehe auch Miquel, 1898).

Wollte man eine Bedeutung in der Harnstoffspaltung suchen, so könnte man den Vorteil darin sehen, daß sie, ähnlich wie die Alkoholbildung der Hefe, den Harnstoffbakterien den Daseinskampf erleichtert, da nichtharnstoffspaltende Bakterien durch stärkeren Harnstoffgehalt oder durch das bei der Spaltung entstehende Ammoniak in der Entwicklung gehemmt, wenn nicht gar getötet werden.

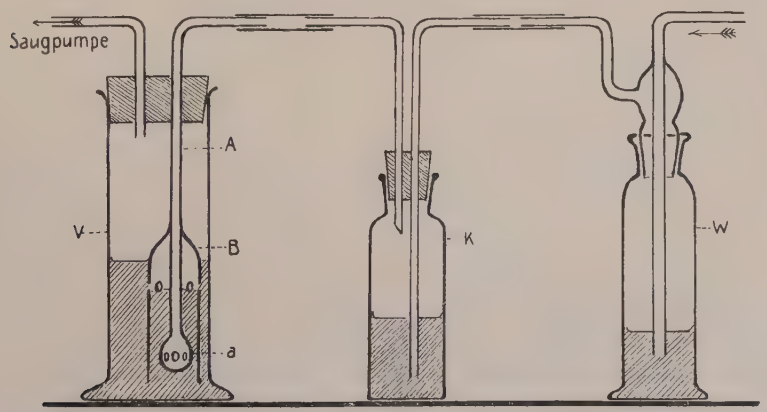
Bei Festlegung der Größe des Spaltungsvermögens bestimmte ich vorzugsweise die Mengen Ammoniak, die nach bestimmten Zeiten aus einer bekannten, der Kulturflüssigkeit zugesetzten Gewichtsmenge Harnstoff freigemacht wurden. Um nun bestimmt festzustellen, ob denn die Spaltung auch im Sinne obiger Gleichung verläuft oder ob bei der Spaltung aus Harnstoff noch Nebenprodukte gebildet werden, bestimmte ich in wenigen Fällen nach einer bekannten, nicht zu langen Versuchsdauer neben dem gebildeten Ammoniak auch noch den unzersetzten Harnstoff. (Die Resultate dieser Versuche sprechen für die Annahme einer glatten Spaltung; die Versuche sollen in peptonfreien Nährlösungen wiederholt werden.)

Ich benutzte deshalb eine Versuchsanordnung, die es mir erlaubte, in derselben Kulturflüssigkeit sowohl Ammoniak als auch Harnstoff zu bestimmen.

In der Literatur sind eine große Anzahl von Ammoniak- und Harnstoffbestimmungsmethoden angegeben; sie sind ausführlich und in kritischer Weise zusammengestellt in Neubauer-Hupperts „Analyse des Harns“, 1910, z. T. auch in Abderhaldens Handbuch 1911.

Zur Bestimmung des Ammoniaks habe ich die von Folin (1902, 1903, 1911) angegebene Methode benutzt und zur Bestimmung des Harnstoffes die von Gill, Allison und Grindley (1909—10) getroffene Abänderung des Benedikt-Gephartschen Verfahrens. Auf die Ausführung komme ich noch zurück.

Versuchsanordnung:



K.: Kulturgefäß.

Das Kulturgefäß war 12 cm hoch, hatte 5 cm Durchmesser und einen Inhalt von 200 ccm.

Als Verschluß der Gefäße nahm ich Korkstopfen aus bestem Kork,

die luftdicht schlossen. Im Korkstopfen waren ebenfalls luftdicht eingepaßt zwei Glasrohre von 0,6 cm innerem Durchmesser; das eine Glasrohr war 30 cm, das andere 20 cm lang, bei beiden waren an dem einen Ende je 5 cm rechtwinklig abgebogen; das kürzere Rohr war an dem geraden Ende mit der Feile abgeschrägt; ich mußte Korkstopfen an Stelle von Gummistopfen nehmen, weil die Kulturgefäße im Heißluftschrank sterilisiert wurden.

W.: Waschflasche für die Luftreinigung (s. Ammoniakbest.).

V.: Vorlage.

Als Vorlage diente ein 20 cm hoher Zylinder aus alkalifreiem Jenaer Glas mit Fuß. Der innere Durchmesser betrug 4 cm, der Inhalt 180 ccm. Durch den Korkstopfen der Zylinderöffnung gingen, luftdicht eingeführt, 2 Glasrohre von 0,6 cm innerem Durchmesser und verschiedener Länge: das eine war 10 cm, das andere 23 cm lang, je 5 cm waren auch hier bei beiden an dem einen Ende rechtwinklig abgebogen. An dem geraden Ende des langen Glasrohres war ein Absorptionsrohr nach Folin angeschmolzen.

A.: Absorptionsrohr nach Folin.

Dieses Absorptionsrohr bestand aus einer Glasröhre, die bei a zu einer kleinen Kugel ausgeblasen war.

In der Kugel waren mit einem glühenden Platindraht 5—6 Öffnungen angebracht worden; sie befanden sich in gleicher Höhe und waren möglichst gleich groß, etwa 1 mm im Durchmesser. Wird die gleiche Lage und Größe beim Anbringen der Löcher nicht beachtet, so werden später während des Versuches beim Durchsaugen der Luft nur einige Löcher in Anspruch genommen und so die Gasblasen nicht gleichmäßig verteilt. Mit der Glasröhre A war ein Zylinder folgender Beschaffenheit verschmolzen worden.

B.: Zylinder zum Absorptionsrohr nach Folin.

Der Glaszylinder war 7,5 cm lang, hatte einen Durchmesser von 2,5 cm und war auch mit Löchern versehen, die hier etwa 2 mm im Durchmesser maßen und in gleicher Höhe, 3 cm vom angeschmolzenen Ende des Zylinders entfernt, angebracht waren.

Vorbereitung des Versuches.

Die oben beschriebenen Kulturgefäße wurden an der Wasserstrahlluftpumpe auf luftdichten Verschluß geprüft, die offenen Glasrohrenden mit Wattepfropfen verstopft und die Flaschen dann im Heißluftschrank bei 140° sterilisiert. Nach der Sterilisation wurden die noch heißen Gefäße mit 20 ccm heißer steriler Harnstoffbouillon, die in Rex-Konservenflaschen sterilisiert worden waren, beschickt; zur Abmessung diente ein steriler Meßzylinder oder ein geeichtes Reagensrohr mit Ausguß. Zur Abhaltung von Luftkeimen wurde das Eingießen der Kulturlösung und die Impfung unter einer Glasplatte vorgenommen. Die Impflösung ließ ich meist durch eine sterile Pipette einlaufen. Da beim Öffnen der Kulturflaschen wie beim Schließen durch die Hände immerhin eine Infektion möglich war, so wurden auch diese möglichst keimfrei gemacht. Nach der Impfung der Bouillon wurden die Glasrohrenden der Gefäße an Stelle der Wattepfropfen zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten mit kurzen Schlauchstücken versehen, die nach außen hin durch Klemmen und Glasstäbe verschlossen waren. Die Kulturflaschen kamen dann in den Brutraum oder Brutschrank, wo sie bei konstanter Temperatur eine bestimmte Zeit stehen blieben.

Ammoniak-Bestimmung.

Zur Bestimmung des in den Kulturen aus Harnstoff gebildeten Ammoniaks benutzte ich zuerst die Methode von Folin, bei der das Ammoniakgas durch einen Luftstrom in eine Säurevorlage übergeführt wurde; ich benutzte die Saugluft einer guten Wasserstrahlluftpumpe.

Zwecks Vornahme der Ammoniakbestimmung wurde die erste Kulturflasche mit der auf den Ammoniakgehalt zu untersuchenden Kultur an zwei Vorlagen angeschlossen: der kürzere Glasrohrschenkel der Kulturflasche kam in Verbindung mit der schon erwähnten oben beschriebenen Säurevorlage, der längere mit einer Luftreinigungsvorlage; diese bestand aus 2 Waschflaschen (p. 76 und W der Fig.), einer mit etwa 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure, und einer mit ebensoviel gesättigter Natriumkarbonatlösung gefüllten Waschflasche. Durch die Waschung mit Schwefelsäure kam nur ammoniakfreie Luft zur Verwendung; etwas mitgerissene Spuren von Säure wurden dann beim Durchleiten durch die Natriumkarbonatvorlage zurückgehalten.

Die gewählte Versuchsanordnung erlaubte es mir, eine große Reihe von Versuchen nebeneinander gleichzeitig vorzunehmen, indem ich eine Luftreinigungsvorlage benutzte, und dann hintereinander abwechselnd Kulturlösung und Säurevorlage einschaltete. Das kurze Rohr der Kulturflasche mußte dabei immer mit dem Absorptionsrohr der Säurevorlage verbunden sein. Die Luftdurchleitung durch mehrere Flaschen und Vorlagen machte gar keine Schwierigkeiten, wenn diese luftdicht schlossen.

Dadurch, daß bei meinen Versuchen die Anschlüsse mit den Schlauchstücken der Kulturflaschen gemacht werden konnten, ohne den Klemmenverschluß zu öffnen, waren Verdunstungsverluste ausgeschlossen.

Das nicht gebundene Ammoniak wurde zunächst ohne Zugabe von Alkali in die Säurevorlage übergeführt; als Indikator legte ich ein feuchtes rotes Lackmuspapier nach kurzer Zeit der Luftdurchleitung und nach dem Abklemmen der Kulturlösung in den Anschlußschenkel der Säurevorlage. War nach Ingangsetzung des Versuches kein Ammoniak mehr nachzuweisen, dann wurde der Stopfen der Kulturgefäße gelüftet und nach einem Zusatz von 10—20 ccm Methylalkohol (später Äthylalkohol), 10,0 g Natriumchlorid und 2—3 g kristallisiertem Natriumkarbonat sofort wieder geschlossen. In einigen Versuchen wurde die mit Alkohol gemischte Salzlösung mittels des Luftstromes durch den langen Ansatzschenkel in die Kulturflaschen hineingesogen; diese Methode wurde weniger häufig angewandt, weil durch Zugabe der Salzlösung, an Stelle des festen Salzes die Flüssigkeitsmenge in der Kulturflasche vermehrt und die zur völligen Austreibung des Ammoniaks erforderliche Dauer der Luftdurchleitung vergrößert wurde.

Zur Vermeidung des Schäumens der Kulturlösung beim Durchströmen der Luftblasen machte ich ihr Zusätze von flüssigem Paraffin, Toluol oder Alkohol; Alkohol bewährte sich weitaus am besten; da er allmählich verdunstete, gab ich von vornherein genügend davon zur Flüssigkeit, sog wohl auch öfters noch während des Versuches einige Kubikzentimeter in die Flaschen ein.

Zur Austreibung des Ammoniaks habe ich versuchsweise auch Barythydrat an Stelle von Natriumkarbonat der Flüssigkeit zugesetzt; in späteren Versuchen nahm ich jedoch davon Abstand, da Barythydrat in diesen kohlensäurereichen Flüssigkeiten unlösliche, am Boden haftende Krusten von Baryumkarbonat bildete. Gegen den Schluß der Luftdurchleitung wurden

die Kulturgefäße in Glashäfen mit etwa 30° warmem Wasser gestellt, um die Kohlensäure auf diese Weise aus der Säurevorlage auszutreiben.

Die Austreibung des Ammoniaks war bei Zimmertemperatur gewöhnlich nach 6 Stunden beendet; die Dauer der völligen Austreibung ist abhängig von der Temperatur der Kulturflüssigkeit, von der Menge des auszutreibenden Ammoniaks und von der Stärke des angewendeten Luftstromes. Daß diese Verhältnisse zu berücksichtigen sind, daß ferner vor allem die Austreibung des Ammoniaks eine vollständige ist, geht aus den Resultaten der folgenden Versuche hervor:

1. Einfluß der Temperatur auf die Dauer der Austreibung.

In 5 ccm einer 3-proz. Harnstofflösung ($^1/_1$ normal), die mit Schwefelsäure oder Salzsäure im Autoklaven hydrolysiert worden war, wurde der Ammoniakgehalt nach der oben beschriebenen Methode bestimmt. Vorgelegt waren 20 oder 30 ccm n/Schwefelsäure.

Wurden die Kulturflaschen von Anfang an in Glashäfen mit warmem (höchstens 40°), nach der Abkühlung wieder erneuertem Wasser gestellt, so war in allen drei Versuchen die Austreibung des Ammoniaks schon nach 4 Stunden beendet; es wurden genau 5 ccm n/Schwefelsäure gebunden von den ursprünglich angewendeten 5 ccm n/Harnstofflösung; in anderen Versuchen wurden die Kulturflaschen nicht in warmes Wasser gestellt, sondern blieben bei 17—20° stehen; nach 3 Stunden der Luftdurchleitung waren 3 ccm, nach 4 Stunden 4,4 ccm und nach 7 Stunden 5 ccm gebunden; Anwendung von Wärme beschleunigt also die Austreibung des Ammoniakgases, diese ist eine völlige. Eine 40° übersteigende Temperatur ist aber zu vermeiden, da dann etwa in der Kulturlösung noch unzersetzt vorhandener Harnstoff vom Alkali angegriffen wird.

2. Einfluß der Ammoniakkonzentration auf die Dauer der Austreibung.

Es wurden 5 und 10 ccm einer 2/normalen (13,2-proz.) Ammonsulfatlösung nach der gleichen F o l i n schen Methode bestimmt, die Kulturflaschen standen bei etwa 17°. Vorgelegt waren 20 resp. 30 ccm n/H_2SO_4.

Während nun in den mit 5 ccm obiger Lösung nach zehnstündigem Durchleiten angesetzten Versuchen 9,8—10 ccm n/H_2SO_4 gebunden wurden, das Ammoniakgas also alles ausgetrieben war, hatten die mit 10 ccm unternommenen Versuche nach der gleichen Zeit statt 20 ccm nur 16,3 ccm verbraucht.

3. Einfluß der Stärke des Luftstromes auf die Dauer der Austreibung.

Übereinstimmend mit den F o l i n schen Angaben (l. c.) habe ich oft feststellen können, daß bei stärkerem Luftstrom das Ammoniak schneller in die Vorlage übergeführt wird. F o l i n hat hierüber quantitative Versuche gemacht.

Die Titration des in die Säurevorlage übergeführten Ammoniaks konnte meist schon in der Säurevorlage selbst vorgenommen werden.

Als Indikator fand Alizarin in alkoholischer Lösung (1 : 100 Alkohol absolutus) Verwendung; ein Zusatz von 2—3 Tropfen genügte meist, um den Umschlag scharf anzuzeigen; der Farbstoff ist in Säuren gelb, in Alkalien rot. Geringe Mengen Kohlensäure, die mit in die Vorlage übergeführt war, beeinträchtigten nicht den Farbenumschlag; dieser war bei Verwendung von Normallösungen selbst bei Lampenlicht gut zu sehen.

Zur Bestimmung des Ammoniaks benutzte ich ferner noch folgende Methode: Durch den kurzen Glasrohrschenkel der die vergorene, ammoniakalische Kulturflüssigkeit enthaltenden Kulturflaschen ließ ich titrierte Säure im Überschusse, aber in ganz bestimmter Menge zur Kulturlösung fließen; an dem innen abgeschrägten Ende des kurzen Glasrohres lief die Säure gut ab, zumal wenn das Ende mit dem längeren Glasrohr in Berührung stand und die Flüssigkeit an diesem herablaufen konnte. Das Umschütteln der Kulturlösung erfolgte erst, als die erforderliche Menge Säure zugegeben und das Gefäß durch den Klemmenverschluß wieder verschlossen war; schüttelt man zu früh, so wird durch die freigemachte Kohlensäure ein Überdruck im Innern erzeugt und die im Schenkel befindliche Säure steigt, zumal wenn das Glasrohr sehr eng ist, zurück, anstatt abzufließen; mit Hilfe eines kräftigen Luftstromes läßt sie sich natürlich immer wieder in die Kulturlösung treiben. Durch das Umschütteln wird alles Ammoniak von der Säure aufgenommen; die Kohlensäure ausgetrieben. Mittels einer Spritzflasche brachte ich in den wieder geöffneten kurzen Schenkel Wasser und spülte so die Säurespuren zur Kulturflüssigkeit, ebenso spülte ich den anderen, bis dahin noch verschlossenen Schenkel mit Wasser nach und öffnete schließlich das ganze Gefäß. Ich setzte im ganzen etwa 100 ccm Wasser hinzu, um die gelbe Farbe der Bouillon aufzuhellen; die Kohlensäure wurde durch kräftiges Schütteln der Flüssigkeit zum größten Teile entfernt; der zurückbleibende Teil beeinträchtigte nicht das Resultat, wie ich mich bei Kontrollversuchen, die zur Entfernung der Kohlensäure erwärmt wurden, überzeugen konnte.

Nach Zugabe von Alizarinlösung wurde dann, wie oben die im Überschusse vorgelegte Säure mit n/Kalilauge zurücktitriert.

Die Brauchbarkeit der Methode ergab sich dadurch, daß von völlig vergorener Harnstoffbouillon, die 2 Proz = 0,4 g enthielt, 13,3 ccm Säure = 0,393 g Harnstoff gebunden wurden.

Diese Methode der Ammoniakbestimmung wurde vor allem in den Versuchen benutzt, in denen neben der Größe der Harnstoffspaltung auch die Keimzahl bestimmt wurde. Wie bei Beschreibung der Zählmethode noch näher ausgeführt wird, wurde der Kulturlösung nach dem Säurezusatz und dem Umschütteln immer 1 ccm entnommen, der dann in geeigneter Weise weiter verdünnt, zur Feststellung der Keimzahl Verwendung fand.

Harnstoffbestimmung.

Zur Bestimmung des Harnstoffgehaltes im Harn empfahlen Benedikt und Gephart (1909) nach der gesonderten Bestimmung des präformierten Ammoniaks die Hydrolyse der Flüssigkeit mit verdünnter Salzsäure im Autoklaven bei 6 Atmosphären; das gebildete Ammoniak trieben sie durch Destillation mit Lauge aus und titrierten es dann. Da bei der Destillation mit Lauge auch andere N-haltige Substanzen, wie Kreatinin und Harnsäure unter Ammoniakabspaltung zerlegt werden, so trieben Gill, Allison und Grindley (1909 oder 1910) das bei der Hydrolyse gebildete Ammoniak nach Folin (1902) in der Kälte durch einen Luftstrom aus. Ich verfuhr in der gleichen Weise und benutzte zur Hydrolyse im Autoklaven Röhren aus schwer schmelzbaren alkalifreiem Glas; sie waren ähnlich geformt, wie die in der Bakteriologie zum Teil noch gebräuchlichen anaëroben Röhren nach Buchner und faßten unterhalb der Einschnürung meist 25 ccm Flüssigkeit. Die Verengung hatte einen Durchmesser von 3—4 mm, damit die am inneren Rande in dünnen Strahlen ausströmende Flüssigkeit

gut ablaufen konnte. Die Gläser wurden gewöhnlich mit höchstens 20 ccm gefüllt und nach dem Abschmelzen des oberen Ansatzstückes im Autoklaven bei 6 Atmosphären und ca. 160° 1½ Stunden erhitzt. Die Gläser konnten nach dem Öffnen ihrer Spitze und nach dem Anschmelzen eines Ansatzes immer wieder benutzt werden.

Ihr Inhalt wurde quantitativ in die bei Besprechung der Ammoniakbestimmung schon erwähnten Kulturgefäße übergeführt und die Bestimmung des gebildeten Ammoniaks in der dort beschriebenen Weise nach Folin ausgeführt.

Zur Kontrolle der völligen Hydrolyse im Autoklaven machte ich Versuche mit n/Harnstofflösung; die Versuche, die ich schon p. 78 angeführt habe, ergaben die völlige Spaltung des Harnstoffes in Ammoniak und Kohlensäure.

Daß auch kürzere Erhitzungsdauer und geringerer Druck im Autoklaven zur Hydrolyse ausreichen, zeigen folgende Versuche: 1. 5 ccm n/Harnstofflösung wurden mit 10 ccm n/Salzsäure 1½ Stunden bei 3 Atmosphären und 143° im Autoklaven erhitzt; nach dem Austreiben der Kohlensäure wurde die überschüssige Säure zurücktitriert, wozu genau 5 ccm n/Lauge erforderlich waren: die Hydrolyse war also eine vollständige.

2. 10 ccm n/Harnstofflösung wurden in einer 30 ccm-Röhre mit 15 ccm n/Schwefelsäure 1 Stunde bei 4 Atmosphären und 150° im Autoklaven erhitzt: Zur Neutralisation waren genau 5 ccm n/Lauge erforderlich, also auch hier aller Harnstoff gespalten.

Da in diesen Versuchen die Versuchsflüssigkeit völlig farblos war, so konnte die Titration des Ammoniaks direkt durch Zugabe von Lauge und Alizarin als Indikator vorgenommen werden; es geht sogar aus den Versuchen hervor, daß sich der Harnstoff in farblosen, neutralen Lösungen sehr einfach bestimmen läßt, indem man eine bestimmte Menge titrierter Schwefelsäure (besser geeignet als die Salmiaknebel bildende Salzsäure) zugibt, hydrolysiert und nach dem Entfernen der Kohlensäure den Überschuß an Säure zurücktitriert.

In den nach der Hydrolyse gelb-rotbraun gefärbten Peptonbouillon war eine direkte Titration des NH_3 nicht möglich.

Kapitel 8.

Allgemeines und Methodisches über Bakterienzählung.

Allgemeines.

Es gibt eine größere Anzahl von Methoden zur Bestimmung der Keimzahl; die Methoden fußen:

1. Auf der Bestimmung der Anzahl von Kolonien, die unter bestimmten Umständen auf Plattenkulturen entstehen.

2. Auf der Gewichtsbestimmung der durch Chemikalien ausgefällten Bakterien.

3. Auf mikroskopischer Auszählung eines gefärbten Bakterienausstriches.

4. Auf mikroskopischer Auszählung von Bakterien in einer Zählkammer.

Kurze kritische Besprechung der Zählmethoden:

Aus den zahlreichen Angaben in der Literatur über Bakterienzählungen, ich erwähne hier besonders Mac Neal, Latzer und Kerr (1909) und Breed, Robert (1911), da diese Forscher kritisch vergleichende

Versuche gemacht haben, geht hervor, welche Nachteile die oben genannten Methoden haben. Ich beschränke mich hier auf eine kurze kritische Zusammenstellung, ohne auf die sehr umfangreiche Literatur näher einzugehen.

1. Die ursprünglich von Buchner, Longard und Riedlin (1887) angegebene, später verbesserte Auszählung von Plattenkolonien gibt viel zu niedrige Werte.

Als Nachteile und Fehlerquellen sind zu berücksichtigen:

a) Die Kolonien gehen nicht immer, wie bei dieser Zählungsmethode vorausgesetzt wird, aus je einem einzelnen Keime, sondern sicher zum Teil auch aus Zellverbänden hervor.

b) Die Kulturverhältnisse, wie Nährtemperatur und Sauerstoffbedingungen, haben einen sehr großen Einfluß auf die Zahl der entstehenden Kolonien.

c) Die Zählung kann frühestens erst nach etwa 8 Tagen vorgenommen werden.

2. Die besonders von Rubner (1904) empfohlene Gewichtsbestimmung der durch Chemikalien ausgefällten Bakterien ist nicht brauchbar:

a) Alle Verunreinigungen, wie Nährbodenreste, ferner Schleim, Kristalle, Reservestoffe usw. werden mit gewogen.

b) Das Trocknen der Bakterienmasse hat zweifellos einen wägbaren Verlust flüchtiger Stoffe zur Folge.

c) Beim Abschleudern der Bakterien mit der Zentrifuge zwecks besserer Trennung und Entfernung des Nährbodens werden diese nicht quantitativ isoliert.

d) Die Gewichtsbestimmung ist umständlich und zeitraubend.

e) Wird nicht gleichzeitig die Anzahl der Bakterien festgestellt, so gibt die Methode der Gewichtsbestimmung nur relative Werte.

3. Die von Klein (1900, 1902 und 1906) angegebene und verschiedentlich verbesserte Methode beruht auf der mikroskopischen Auszählung eines gefärbten Ausstriches und hat folgende Nachteile:

a) Die Dosierung der Ausstrichflüssigkeit ist eine ungenaue.

b) Die Bakterien sind im Ausstrich nicht gleichmäßig verteilt, die Schicht ist verschieden dick.

c) Bakterienklumpen und kleinere Zellverbände werden durch die hier empfohlene Art der Färbung und des Ausstriches nicht zu Einzelzellen aufgelöst.

d) Verunreinigungen, die durch die Art der Färbung noch vermehrt werden, erschweren oft sehr die mikroskopische Zählung.

Da, wo als Verbesserung der Methode ein Zentrifugieren der ursprünglichen Bakterienmischung empfohlen wird, gilt das oben erwähnte.

4. Winterberg (1898) empfahl die mikroskopische Auszählung von Bakterien in einer Zählkammer.

Ich benutzte die Methode der Zählkammerzählung, da diese mir bei größter Einfachheit der Ausführung doch in kürzester Zeit die besten Resultate zu geben schien. Wie sich jedoch, übereinstimmend mit den diesbezüglichen Angaben in der Literatur herausstellte, hafteten der Methode Nachteile an, die erst beseitigt werden mußten: so waren

a) die Eigenbewegung sowohl, wie vor allem die Molekularbewegung der in der Zählkammer eingeschlossenen Bakterien sehr störend für die genaue Zählung;

b) ließ das häufigere Vorkommen von unzählbaren Bakterienhäufchen ein genaues Resultat nicht erwarten;

c) erschwerten Verunreinigungen nicht bakterieller Natur ungemein das Auszählen des mikroskopischen Bildes;

d) waren die Bakterien und zumal ihre Septen ohne Färbung nicht immer deutlich zu erkennen;

e) mußten die Bakterien, um Fehler zu vermeiden, die durch nachträgliche Vermehrung beim Stehen zu erwarten waren, sofort nach Beendigung des Versuches gezählt werden.

Um diese Übelstände zu beseitigen, machte ich nun folgende, von Erfolg gekrönte Versuche:

a) Aufhebung der Eigenbewegung, Molekularbewegung und Beschleunigung des Absetzens in der Zählkammer.

Während sich Gelatine, die in verschiedenen Konzentrationen zur Zählflüssigkeit zugesetzt wurde, nicht eignete, da sie zwar die Bewegung aufhob, aber das völlige Absetzen der Zellen verhinderte, erfüllte ein Zusatz von 1—5proz. Schwefelsäure sehr gut den gewünschten Zweck.

b) Auflösung der Klumpen und Zellverbände zu Einzelzellen.

Der Zusatz von verdünnter oder konzentrierter Schwefelsäure in der Kälte oder in der Wärme vermochte nicht die Klumpenbildung aufzuheben; vielfach wurden hierbei teilweise die Zellen zerstört. Kalilauge verschiedener Konzentration löste wohl die Bindesubstanz (sehr wahrscheinlich Schleim) der Zellverbände, aber nach längerer Berührung mit ihnen auch die Zellen selbst.

Frisch bereitetes Kupferoxydammoniak löste schon in wenigen Minuten völlig den Schleim (?) der Zellverbände, ohne die Zellen selbst nach mehrtägiger Berührung damit zu zerstören.

c) und e) Beseitigung der Verunreinigungen und Verhütung der Zellvermehrung.

Kupferoxydammoniak im Verein mit 1—5proz. Schwefelsäure lösten die störenden Verunreinigungen nichtbakterieller Natur und verhüteten die Vermehrung; sie zerstörten auch innerhalb weniger Tage nicht die Zellen, so daß nach ihrem Zusatz ein sofortiges Auszählen der Zählflüssigkeit nicht nötig war.

d) Sichtbarmachung der Bakterien durch Färbung zur Erleichterung der Zählung.

Durch Färbung mit Methylenblaulösung, die der mit Kupferoxydammoniak und verdünnter Schwefelsäure versetzten Zählflüssigkeit zugefügt wurde, ließen sich die Zellen und ihre Septen sehr deutlich hervorheben, gut zählen und von den Zellresten unterscheiden; besonders vorteilhaft erwies sich die Färbung bei der Sporenzählung zur Unterscheidung von gesunden, toten oder leeren Sporen — wie Sporangienmembranen.

Apparate zur Bakterienzählung.

1. Zählkammer nach Thoma-Zeiß (Abbildung in der Zeiß-schen Preisliste, in Kossowicz 1911; Abderhalden 1911, III, p. 2; besonders gut in Lafar, Bd. 5. p. 175).

Auf einem Objektträger ist ein 0,2 mm dicker Glasrahmen mit zentralem, kreisförmigem Ausschnitte aufgekittet, in der ein zweites, genau 0,1 mm dickes Glasplättchen befestigt ist; auf diesem Glasplättchen ist eine Netzmikrometerteilung eingeritzt, die die Mitte der 0,1 mm hohen Kammer einnimmt; es sind zwei zueinander senkrecht stehende Systeme von je 21 Linien eingeätzt, die in einem Abstande von 0,05 mm einander parallel laufen

und so 400 quadratische Felder von je 0,0025 qmm Flächeninhalt bilden $= {}^1/_{400}$ mm². Da die Kammerhöhe genau 0,1 mm beträgt, so ist der Rauminhalt über jedem Quadrat $= {}^1/_{4000}$ mm³.

Man muß also die bei der Zählung im Mittel für ein Quadrat gefundene Zahl mit 4 Tausend multiplizieren, um die in einem Kubikmillimeter, mit 4 Millionen, um die in einem Kubikzentimeter enthaltene Anzahl von Keimen zu erhalten.

Die 0,2 mm hohe Zählkammer eignet sich weniger gut für die Zählung von Bakterien, da sich die Keime etwas schwerer absetzen, vor allem aber, weil sich bei der höheren Kammer die stärksten Trockensysteme nicht anwenden lassen und somit die Bakterien nicht deutlich genug erkannt werden können.

2. Deckglas.

Zum Bedecken der Zählkammer muß man planparallele Deckgläschen nehmen, da nur dann die in der Kammer eingeschlossene Flüssigkeit überall gleich hoch ist und nur unter diesen Bedingungen gleichmäßige Resultate zu erwarten sind. Die Dicke der Deckgläschen richtet sich nach der Stärke der zur Verwendung kommenden Linse: nimmt man z. B. die Linse D von Zeiß, so kann man noch 0,2 mm dicke Gläschen verwenden, beim Arbeiten mit Linse E kann man nur 0,15—0,17 mm dicke gebrauchen.

3. Maß und Vollpipetten.

a) Drei in ${}^1/_{40}$ Grade eingeteilte, geeichte 1 ccm-Pipetten (zur Blutzählung gebräuchlich).

b) 1—5 ccm, 10-, 15- und 20 ccm-Pipetten.

4. Schüttelpipette.

Die Schüttelpipette ist ganz ähnlich konstruiert, wie die von A. Meyer (1901. p. 126) angegebene Zählpipette; eine ziemlich enge Glasröhre zeigt an der Spitze eine birnförmige Erweiterung, in die ein kleiner Platinring eingeschmolzen ist, der beweglich ist und als Schüttelkörper dient; die Spitze ist möglichst stumpf und hat eine verhältnismäßig große Öffnung. Die Pipette wird mit einem Gummiball verschlossen. (Die Pipette ist zu beziehen von O. Kobe, Marburg a. L.)

5. Okular und Objektiv-Linsen.

Zur Einstellung des Systems auf das Mikrometernetz und zur Beurteilung der gleichmäßigen Verteilung des Keimmaterials auf dem Netz sind die Okulare 2 und 12 und das Objektiv B von Zeiß zu verwenden resp. zu empfehlen.

Zur Zählung der Sporen und Oidien sind von den Objektiven der Firma Zeiß D und E zu gebrauchen; nimmt man D, so kann man bei guter Beleuchtung noch mit den Okularen 12 und 18 beobachten; nimmt man das Trockensystem E, so kann man selbst bei recht kleinen Bakterien noch Okular 4 zur Zählung verwenden und braucht nur in zweifelhaften Fällen mit den Kompensationsokularen 8 und 12 genauer nachzusehen.

Beleuchtung.

Die Zählungen sind möglichst bei Tageslicht (weißem Wolkenlicht) vorzunehmen, da dann das Gesichtsfeld am hellsten und die Färbung am deutlichsten ist: mithin die Zählung am schnellsten und sichersten vor sich geht und die Augen am wenigsten angestrengt werden. Brauchbar war auch die A. Meyersche Mikroskopierlampe.

Reagentien zur Bakterienzählung.

1. Kupferoxydammoniak.

Das Kupferoxydammoniak ist frisch herzustellen; am einfachsten ist die Darstellung nach Mulder (1863) durch Auflösung von Kupferspänen in Ammoniak bei Gegenwart von Sauerstoff: Man füllt in eine lange mit Schlauch und Quetschhahn verschlossene Glasröhre Kupferspäne, übergießt sie völlig mit 30-proz. Ammoniak (0,91 spez. Gew.) und deckt die obere Rohröffnung mit einer Glaskappe. Die beim Öffnen des Hahnes ablaufende Flüssigkeit gießt man so lange zurück, bis reine Zellulose (entfettete Watte) gelöst wird. Das Reagens ist in gut schließenden Gefäßen aufzubewahren, seine Haltbarkeit ist gering.

2. 1- oder 5-proz. Schwefelsäure je nach der vorzunehmenden Verdünnung.

3. Methylenblaulösung 1 + 10.

Ein Raumteil einer gesättigten Lösung von Methylenblau in 95-proz. Alkohol wird mit 10 Teilen keimfreiem Wasser gemischt und filtriert.

Ausführung der Zählmethode.

Mischung der Zählflüssigkeit.

Man bringt mit der geeichten sterilen 1 ccm-Pipette 1 ccm aus der zu zählenden, gut umgeschüttelten und ganz gleichmäßig getrübten Flüssigkeit in ein trockenes, keimfreies Kölbchen, setzt Kupferoxydammoniak hinzu, läßt die Mischung unter öfterem Umschütteln kurze Zeit verschlossen stehen und versetzt dann mit verdünnter Schwefelsäure bis zur völligen Klärung. Sind nur wenig Bakterien in der zu zählenden Kulturflüssigkeit vorhanden, so nimmt man 5-proz. Schwefelsäure, von der man nur etwa 1 ccm zuzusetzen brauch; enthält die Kulturflüssigkeit sehr viel Keime, so setzt man mehrere Kubikzentimeter 1-proz. Schwefelsäure hinzu. Die Menge der zuzusetzenden Methylenblaulösung richtet sich nach dem Säurezusatz, nach der Art der Lichtquelle und nach der Farbenempfindlichkeit des untersuchenden Auges. Nimmt man 5-proz. Schwefelsäure, so wird man meist etwa die doppelte Menge Methylenblau nehmen können, nimmt man 1-proz. Schwefelsäure, so wird man etwa auf je 10 ccm Säure 2—3 ccm der Methylenblaulösung zusetzen können, um deutlich gefärbte Zellen und Septen zu erhalten.

Einfüllung der Zählflüssigkeit.

Aus der etwa 1 Minute umgeschüttelten Mischung nimmt man noch während des Schüttelns etwa ½ ccm mit der Schüttelpipette heraus, entfernt die außen haftende Flüssigkeit mit Fließpapier, schüttelt den Inhalt in horizontaler Richtung mehrmals durch und bringt dann sofort einen kleinen Tropfen in die Mitte der Kammer, die so schnell wie möglich mit einem planparallel geschl. Deckglase bedeckt wird. Um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden (Bedingung!), setze man das Deckglas seitlich an und schiebe es in horizontaler Richtung über den Flüssigkeitstropfen. Ist der Tropfen zu klein, so sind Luftblasen nicht zu vermeiden; ist er zu groß, füllt er also nicht nur die eigentliche Kammer und die diese umgebende Rinne, sondern tritt er auch über den Glasrahmen hinaus, so wird das Deckglas, das normalerweise direkt auf dem Glasrahmen liegen soll, durch eine Flüssigkeitsschicht von diesem getrennt, dadurch aber auch die Höhe der Kammerflüssigkeitsschicht größer als 0,1 mm und das Zählresultat am Ende zu hoch; in beiden Fällen ist natürlich das Präparat zu erneuern.

Beobachtung und Zählung des Präparates.

Sieht man schon bei schwacher Vergrößerung, die so zu wählen ist, daß man etwa gerade das ganze Netz übersehen kann, eine unregelmäßige Verteilung der zu zählenden Zellen auf dem Mikrometernetz oder unzählbare Häufchen, so sind neue Präparate mit besser umgeschüttelter Zählflüssigkeit anzufertigen.

Die Zählung wird erst nach völligem Absetzen der Keime vorgenommen, was meist schon nach 15—30 Minuten geschehen kann. Nach den Berechnungen Abbees (1878) empfiehlt es sich, möglichst viel Quadrate der Zählkammer auszuzählen, da mit der Zahl der gezählten Zellen natürlich die Genauigkeit der Zählung wächst. Man wird also möglichst alle 400 Quadrate auszählen, aber auch, wie aus einem Teil meiner Kontrollversuche hervorgeht, bei Auszählung einer weit geringeren Anzahl von Quadraten immerhin noch brauchbare und vergleichbare Werte erwarten dürfen, natürlich unter der Voraussetzung einer gleichmäßigen Verteilung des Keimmaterials auf dem Mikrometernetz.

Sporenzählung.

Bei der Sporenzählung zählt man nur die lebenden Sporen; bei diesen ist durch den Zusatz der Methylenblaulösung nur die Membran deutlich blau gefärbt, während das Sporenplasma keine oder doch nur ganz schwache Blaufärbung, ferner eine noch deutliche Lichtbrechung zeigt; die toten Sporen dagegen sind völlig gefärbt, auch ihr Inhalt ist blau und nicht lichtbrechend.

Stäbchen- und Fadenzählung.

Hat man Fäden oder Stäbchen verschiedener Länge ohne oder mit unregelmäßiger Septenbildung zu zählen, so empfiehlt es sich nach meinen Erfahrungen bei nicht sporenbildenden Formen ihre durchschnittliche Länge, bei den sporenbildenden Bakterien die Länge des Normal-Sporangiums als Einheitsgröße der Zählung zugrunde zu legen; ein Faden also, der z. B. 3-lang, d. h. 3-mal so lang als das Normalsporangium ist, aber noch keine Septierung oder unregelmäßige Septierung zeigt, wird als 3 Stäbchen gerechnet. Um die Schwierigkeiten in der Beurteilung der Größen zu erleichtern, vergleicht man die Zellen öfters unter Zuhilfenahme eines Zeichenapparates mit einer Aufzeichnung der Einheitsgröße und berechnet alle Größen bis 1½ mit 1, von 1½—2½ mit 2 usw.

Anmerkung: Man könnte auch so verfahren, daß man die Stäbchen mäße und ihre Länge auf die Einheit des Längenmaßes bezöge. Mit Vorteil würde man dabei sicher ein Okularmikrometer benutzen können; dieses müßte auf den Normal-Objektivmikrometer geeicht, für Bakterienmessungen brauchbar sein und am zweckmäßigsten aus einem Netz von sehr kleinen, gleich großen Quadraten bestehen, die die Messung der Bakterien nach jeder Flächenrichtung hin erlaubten.

Stäbchen- und Fadenzählung in meinen Versuchen.

Ich habe die Stäbchen -und Fadenzählung in meinen Versuchen in verschiedener Weise vorgenommen.

1. In den ersten Versuchen wurde nur die mit Methylenblau sichtbar gemachte Septenbildung der Oidien bei ihrer Zählung berücksichtigt. Selbst lange Fäden, die keine Stäbigkeit oder Zelligkeit zeigten, wurden in Übereinstimmung mit der Zählungsart Winterbergs (1898) als ein Stäbchen gerechnet.

Das Resultat der Zählung beruhte also auf der Zählung von einstäbigen und fädigen Oidien.

Da der Eintritt der Septierung unregelmäßig und die Neigung zur Fadenbildung bei den verschiedenen Stämmen verschieden groß war, so mußten sich diese Unterschiede am Ende auch an den Zählresultaten geltend machen, die keinen Vergleich der verschiedenen Stämme zuließen.

2. Bei einigen weiteren Versuchen wurde der Zählung der Stäbchen die Septierung zugrunde gelegt; abweichend aber von der ersten Zählungsart wurden hier die unseptierten Fäden nach der durchschnittlichen Länge der im gleichen Präparate vorkommenden Stäbchen gemessen.

Das Resultat beruhte also auf der Zählung einstäbiger Oidien.

Diese Zählungsart eignete sich besser für den Vergleich, eine Einheitlichkeit des Zählresultates war aber auch hier wegen der ungleichen Länge der Stäbchen und ihrer Septen in den verschiedenen vergleichenden Versuchen nicht zu erwarten.

3. In den abschließenden Hauptversuchen wurde der Zählung die durchschnittliche Größe des Normalsporangiums zugrunde gelegt, in einigen Fällen auch gleichzeitig die Septierung berücksichtigt.

Das Resultat der Zählung beruhte also auf der Zählung ein-langer Oidien.

Diese Methode der Zählung ermöglichte, wie unsere Versuche zeigen, den Vergleich der Größe der Harnstoffspaltung eines Stammes bei verschiedenen Versuchsbedingungen, wie auch den Vergleich der Harnstoffspaltungsgröße bei den verschiedenen Stämmen und Spezies.

Vorbereitung meiner Zählversuche.

Bakterienmaterial.

Bei der Bestimmung der Spaltungs- und Vermehrungsgröße unter verschiedenen Versuchsbedingungen ging ich immer von einer bestimmten Morphode zur Impfung der Kulturlösungen aus. Wenn auch bei der Einimpfung von Sporenmaterial die Harnstoffspaltung gewöhnlich erst nach 15—20 Stunden nachweisbar ist, so habe ich doch den Sporen bei meinen Versuchen den Vorzug gegeben, da Oidien einer Schwächung leichter zugänglich sind, eine Einheitlichkeit zudem auch bei ihnen wegen ihres verschiedenen Alters kaum erreicht werden kann. Gerade bei Verwendung von Sporen, die durch Abkochen von lebenden Oidien befreit waren, als Ausgangsmaterial bei der Impfung war es mir möglich, immer wieder dasselbe oder doch in gleicher Weise vorgezüchtetes Material zu meinen Versuchen heranzuziehen.

Das Sporenmaterial stammte von Kulturen, die unter bestimmten Bedingungen, welche aus den jeweiligen Versuchen zu ersehen sind, gezüchtet waren.

Sporenzählung.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wurde in folgender Weise bestimmt:

Sporenmischung (Mischung 1): Eine Öse des von der ganzen Oberfläche der betreffenden Kultur entnommenen Bakterienmaterials wurde in den Abkochungsgläschen mit etwa 1 ccm sterilen Wassers bis zur gleichmäßigen Trübung verrührt, ¼ Minute im kochenden Wasserbade erhitzt und dieses Gemisch in etwa 10 ccm sterilen Wassers verteilt, das sich in kleinen sterilen Kölbchen mit langem engen Hals befand. Von dieser Mischung wurden immer 1 ccm mit der bis zu $^1/_{50}$ ccm eingeteilten sterilen 1 ccm-Pipette zur Zählung entnommen und in ein kleines, völlig trockenes, keimfreies Kölb-

chen ausgeleert. Der Rest der Sporenmischung wurde dann in genau abgemessenen Mengen zur Impfung der Kulturlösungen benutzt; die Impfung erfolgte bei den vergleichenden Versuchen erst nach Bestimmung der in 1 ccm der betreffenden Sporenmischung enthaltenen Sporenzahl.

Zählmischung (Mischung 2): Dem Zählungskubikzentimeter setzte ich in den ersten Versuchen genau abgemessene Mengen Schwefelsäure oder Kalilauge oder Kupferoxydammoniak, in den späteren Versuchen ein Gemisch von Kupferoxydammoniak, Schwefelsäure (1-proz. oder 5-proz.) und Methylenblau (1 + 10) hinzu, das je nach der erwarteten Sporenzahl eine etwas verschiedene Zusammensetzung hatte, z. B.:

(meist) 1 ccm der betreffenden Sporenmischung (1)
\+ 1 ccm Schwefelsäure (5 Proz.)
\+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
\+ 2 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 5

oder

1 ccm der betr. Sporenmischung (Mischung 1)
\+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
\+ 1 ccm Schwefelsäure (5 Proz.)
\+ 3 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 6

oder

1 ccm der betr. Sporenmischung (Mischung 1)
\+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
\+10 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
\+ 2 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 14.

Stäbchenzählung.

Die Zahl der in den Kulturlösungen nach Beendigung der Versuche vorhandenen Stäbchen wurde in folgender Weise bestimmt:

Stäbchenmischung (Mischung A): Der mit der Sporenmischung geimpften Kulturbouillon wurde nach bestimmten Versuchszeiten und überschüssigem Zusatz von bestimmten Mengen Normal-Schwefelsäure 1 ccm zur Zählung entnommen, der Rest zur Titration benutzt.

Stäbchenzählmischung (Mischung B): Der nach kräftigem Umschütteln mit steriler Pipette entnommene Zählungskubikzentimeter wurde in ein trockenes, steriles Kölbchen ausgeleert und ebenfalls wie die Sporenmischung mit Kupferoxydammoniak, Schwefelsäure und Methylenblau versetzt, je nach der erwarteten Menge Bakterien mit verschiedenen Mengen, z. B.:

1 ccm der Stäbchenmischung (Mischung A eines Versuchs)
\+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
\+ 2 ccm Schwefelsäure (5 Proz.)
\+ 1 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 5

oder

1 ccm der Stäbchenmischung (Mischung A eines Versuchs)
\+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
\+ 1 ccm Methylenblau (1 + 10)
\+ 4 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
Verdünnung 1 = 7

oder

\+ 1 ccm einer Stäbchenmischung
\+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
\+ 5 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
\+ 1 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 8

oder

1 ccm einer Stäbchenmischung
\+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
\+10 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
\+ 3 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 15

oder 1 ccm einer Stäbchenmischung
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+20 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
+ 4 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 26

Sporenzählung.

Vorversuch, der die Brauchbarkeit der Thoma-Zeißschen Zählkammer beweisen sollte.

Versuchsmaterial: Bacillus probatus, ausgereiftes Sporenmaterial der 63., auf Ammon-Agar gewachsenen Kulturdegeneration.

Mischung 1: Eine Öse des Bakterienmaterials wurde in den Abkochungsgläschen mit ½ ccm sterilen H_2O gut verrührt, ¼ Minute abgekocht und dieses Gemisch dann in 20 ccm sterilen H_2O verteilt.

Mischung 2: 1 ccm der Mischung 1 + 1 ccm Kupferoxydammoniak. Mit dieser möglichst gleichmäßigen Mischung wurde in der p. 84 angegebenen Weise die Zählkammer gefüllt, die Zählung nach dem völligen Absetzen der Sporen vorgenommen.

Versuch 2 zeigt weniger Sporenhäufchen und demgemäß auch eine bessere Verteilung der Sporen in den Feldern; die Sporenmischung war nämlich vor dem Einfüllen in die Zählkammer länger und kräftiger geschüttelt worden als in Versuch 1.

Die Übereinstimmung der Gesamtsporenzahl in den Zählungen 1 und 2 ist eine so gute, daß damit die Brauchbarkeit der Zählkammer für Bakterienzählungen ohne weiteres bewiesen ist.

Zählung 1: auf 400 Quadrate kamen 391 Sporen
„ 2: „ 400 „ „ 395 „
Resultat: „ 800 „ „ 786 „
„ 1 „ „ 0,9825 Sporen
„ 1 ccm „ 0,9825 . 4 Millionen Sporen
„ 1 „ „ 3,92 Millionen Sporen
„ 1 „ der Mischung 1 „ 7,84 „ „

Tabelle IX.
Tabelle der Sporenzahl und Sporenverteilung in der Zählkammer.
Zählung 1.

4	1	0	0	1	0	0	3	3	0	0	1	1	3	0	1	0	0	0	1	19
0	1	0	1	2	2	4	0	0	1	0	0	0	0	1	2	3	0	2	2	21
2	0	2	0	0	2	2	1	0	0	2	0	0	0	1	1	1	0	0	1	15
0	0	0	0	2	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	10
1	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	2	1	3	1	1	16
2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	5	0	1	0	0	0	0	0	1	0	13
1	1	2	2	3	0	0	0	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	16
4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	3	0	0	0	3	0	17
0	2	0	5	5	0	1	0	0	1	1	4	1	0	0	1	1	0	4	3	29
0	0	0	1	1	3	0	1	0	0	2	1	0	3	1	2	3	1	1	2	22
4	1	0	1	0	3	2	0	2	6	1	2	0	0	0	0	0	3	1	0	26
2	0	0	0	5	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	4	2	0	0	18
1	0	0	1	0	2	0	2	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	3	15
0	1	1	0	1	2	5	3	1	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0	1	20
0	1	1	0	1	0	1	2	0	1	1	0	0	1	3	1	2	0	3	1	19
0	0	7	2	0	1	3	0	0	1	2	0	1	5	4	1	3	9	1	0	40
2	0	1	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	1	4	2	0	0	2	0	19
2	0	0	5	0	1	4	1	2	3	0	1	4	0	2	0	0	2	0	1	28
0	0	1	1	0	0	2	1	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	13
2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	6	0	1	1	0	1	0	0	0	15
27	9	17	19	27	19	25	18	22	16	20	20	12	21	22	14	21	25	21	16	= 391

Zählung 2.

3	3	1	3	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	18
0	1	0	1	0	2	0	2	0	2	1	1	0	3	0	1	0	0	0	2	16
0	2	1	0	0	2	0	1	0	0	1	2	2	1	1	0	2	1	2	3	21
0	0	2	1	4	0	0	0	1	2	2	2	1	0	1	1	2	1	1	1	22
2	0	0	1	1	0	2	3	1	1	0	1	1	2	1	1	0	0	0	1	18
1	2	0	1	2	2	2	1	1	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	2	18
1	3	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	0	0	3	18
1	4	0	2	1	1	1	3	0	0	2	2	1	0	1	1	0	0	0	1	21
1	1	1	1	1	1	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	24
2	0	2	0	2	2	2	0	0	1	2	3	1	2	1	1	0	4	1	2	28
1	0	2	0	0	2	2	0	0	0	0	2	1	2	1	1	1	4	1	2	22
1	1	0	0	0	0	3	0	2	2	0	0	3	2	0	1	1	2	0	0	18
1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	3	1	1	3	0	1	1	2	19
1	2	1	2	2	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	16
2	1	0	3	1	3	0	1	0	3	1	0	0	0	1	1	2	0	1	0	20
1	0	0	2	2	4	1	0	2	0	0	0	2	0	4	0	0	2	1	1	22
1	0	3	3	1	2	3	0	2	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	20
0	0	1	0	3	3	2	2	0	2	1	1	0	0	2	2	2	1	1	1	24
2	1	0	2	0	0	0	0	1	1	0	2	0	3	0	1	1	1	0	1	16
1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	2	2	2	0	1	2	0	0	13
22	21	15	25	25	26	22	19	13	17	14	19	21	21	20	19	19	20	12	24	= 395

Kapitel 9.

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Quantitative Versuche ohne Ermittlung der Vermehrungsgröße.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Zusammensetzung der Nährlösung.

Vorversuche.

Kulturgefäß: 150 ccm fassende Erlenmeyer-Kölbchen aus Jenenser Glas mit flachem Boden, verbunden mit einer kugelähnlichen, mit n/Schwefelsaure gefüllten Säurevorlage.

Kulturflüssigkeit: M-Nährlösung (p. 43) + 0,5 Proz. Liebigs Fleischextrakt + 2 Proz. Harnstoff.

1. Menge: 20 ccm. Versuchstemperatur 28°.

Impfmaterial: 7 Tage altes, auf Harnstoff-Mineralagar gewachsenes Oidienmaterial.

a) Nach 1-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 0,05 ccm n/H_2SO_4
b) „ 8- „ „ „ „ „ „ „ 10 ccm n/H_2SO_4
c) „ 9- „ „ „ „ „ „ „ 9 ccm n/H_2SO_4

2. Menge: 50 ccm Kulturflüssigkeit.

Impfmaterial: 3 Tage altes, auf Harnstoff-Mineralagar gewachsenes Oidienmaterial.

a) Nach 1-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 0,1 ccm n/H_2SO_4
b) „ 1- „ „ „ „ „ „ „ 0,1 ccm n/H_2SO_4
c) „ 3 Woch. lang. „ „ „ „ „ „ 28,2 ccm n/H_2SO_4

Das gebildete Ammoniak wurde direkt durch überschüssige Zugabe von Säure und Rücktitration mit n/Lauge bestimmt. 1 ccm n/H_2SO_4 = 0,03 g Harnstoff.

Die Vorversuche lassen erkennen, daß in dieser peptonfreien Nährlösung die Harnstoffspaltung langsam vor sich geht: statt 13 ccm wurden nach 8 und 9 Tagen nur 9 und 10 ccm n/H_2SO_4 = 70—75 Proz., statt 33 ccm nach 3 Wochen nur 28 ccm Säure = 84 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge gebunden.

Hauptversuche:

Kulturgefäß: Siehe die Abbildung und Beschreibung p. 75.

I. Versuchsreihe.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Oidienmaterial einer 8 Tage alten, völlig vergorenen Harnstoffbouillon; diese enthielt ursprünglich 2 Proz. Harnstoff und war mit Sporen der vierten Kulturgeneration geimpft worden.

Impfmenge: 0,5 ccm der gut umgeschüttelten Bouillon.

a) Nach 1-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 11,7 ccm n/H_2SO_4
b) „ 1- „ „ „ „ „ „ „ 11,8 ccm n/H_2SO_4

II. Versuchsreihe.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 5 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Das gleiche wie in der ersten Versuchsreihe.

Impfmenge: Die gleiche wie in der ersten Versuchsreihe.

a) Nach 1-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 9,2 ccm n/H_2SO_4
b) „ 1- „ „ „ „ „ „ „ 9,8 ccm n/H_2SO_4

Die Hauptversuche ergaben, daß in peptonhaltigen Nährlösungen eine viel schnellere Harnstoffspaltung als in peptonfreien eintritt; wie äußerlich deutlich sichtbar, ist das Wachstum bei Peptonzusatz viel stärker. Die Versuche, die bei gleicher Versuchsdauer, mit gleichem Impfmaterial, mit gleicher Impfmenge ausgeführt wurden, zeigen, daß bei Zusatz von 5 Proz. Harnstoff eine geringere Harnstoffspaltung eintritt als bei Zusatz von 2 Proz. Harnstoff, da das Wachstum durch höheren Harnstoffgehalt geschwächt wird.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Menge des Impfmaterials.

A. Qualitative Versuche: Sporen- und Stäbchenzahl wurde nicht festgestellt.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 5 Proz. Harnstoff.

I. Impfmaterial: Ausgereifte Sporen der 41. Kulturgeneration (Ammon-Agar), ¼ Minute im kochendem Wasser erhitzt, nach der gleichmäßigen Verteilung in sterilem Wasser.

1. Impfmenge: 0,1 ccm der gut umgeschüttelten, gleichmäßig verteilten Sporenmischung entnommen mit der 1 ccm-Normal-Pipette.

a) Nach 6-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 22,6 ccm n/H_2SO_4
b) „ 6- „ „ „ „ „ „ „ 22,65 ccm n/H_2SO_4

2. Impfmenge: 0,5 ccm obiger Sporenmischung.

a) Nach 6-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 24 ccm n/H_2SO_4
b) „ 6- „ „ „ „ „ „ „ 24 ccm n/H_2SO_4

II. Impfmaterial: Oidienmaterial einer 8 Tage alten, völlig vergorenen Harnstoffbouillonkultur; diese enthielt ursprünglich 2 Proz. Harnstoff und war mit Sporen der 41. Kulturgeneration geimpft worden.

1. Impfmenge: 0,1 ccm dieser gut umgeschüttelten Bouillon, mit steriler Normalpipette entnommen.

a) Nach 2 Tagen wurden bei der Titration gebunden 3,5 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 2 „ „ „ „ „ „ 3,5 ccm n/H_2SO_4.

2. Impfmenge: 0,5 ccm der gut umgeschüttelten Bouillon.

a) Nach 2-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 9,2 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 2- „ „ „ „ „ „ „ 9,8 ccm n/H_2SO_4.

3. Impfmenge: 1 ccm der umgeschüttelten Bouillon.

a) Nach 2-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 15,8 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 2- „ „ „ „ „ „ „ 13,6 ccm n/H_2SO_4.

Resultat: Die Resultate dieser Versuche lassen erkennen, welch großen Einfluß die Menge des Impfmaterials auf die Größe der Harnstoff-

spaltung hat, zumal dann, wenn die Versuchsdauer eine verhältnismäßig kurze ist. So ist z. B. der Unterschied in der Spaltungsgröße bei 2-tägiger Versuchsdauer viel größer als bei 6-tägiger.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Versuchsdauer.

I. Versuchsreihe.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 10 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Ausgereifte Sporen der 41. Kulturgeneration (Ammon-Agar), in sterilem Wasser verteilt und ¼ Minute im kochenden Wasserbade erhitzt.

Impfmenge: 0,1 ccm dieser umgeschüttelten, gleichmäßig getrübten Mischung mit der Normalpipette entnommen.

a) Nach 4½-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 17 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 9- „ „ „ „ „ „ „ 21 ccm n/H_2SO_4,
c) „ 9- „ „ „ „ „ „ „ 21,2 ccm n/H_2SO_4.

II. Versuchsreihe.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 5 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Oidienmaterial einer 8 Tage alten, völlig vergorenen Harnstoffbouillonkultur; diese enthielt ursprünglich 2 Proz. Harnstoff und war mit Sporen der 41. Kulturgeneration (Ammon-Agar) geimpft worden.

Impfmenge: 1 ccm der gut umgeschüttelten Bouillon, mit Pipette entnommen.

a) Nach 2-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 13,6 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 2- „ „ „ „ „ „ „ 15,8 ccm „
c) „ 4- „ „ „ „ „ „ „ 24,1 ccm „

Aus den Resultaten dieser Versuche geht der Einfluß der Versuchsdauer auf die Größe der Harnstoffspaltung schon deutlich genug hervor; später ausgeführte Versuche mit gleichzeitiger Bestimmung der Stäbchenzahl (siehe die Kurven p. 128—129) zeigen diesen Einfluß noch deutlicher.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Versuchstemperatur.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 5 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: 6 Wochen altes Sporenmaterial der 41. Kulturgeneration in sterilem Wasser gleichmäßig verteilt und ¼ Minute im kochenden Wasserbade erhitzt.

Impfmenge: 0,1 ccm der gut umgeschüttelten, gleichmäßig getrübten Sporenmischung.

I. Versuchsreihe. Versuchstemperatur = 28° C.

a) Nach 6-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 22,6 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 6- „ „ „ „ „ „ „ 22,65 ccm „

II. Versuchsreihe. Versuchstemperatur = 42° C.

a) Nach 6-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 9,7 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 6- „ „ „ „ „ „ „ 14 ccm „

Aus den Versuchen geht hervor, daß bei 42° bedeutend weniger Harnstoff gespalten wird als bei 28°; eine Erklärung für die etwas voneinander abweichenden Resultate der II. Versuchsreihe kann ich nicht geben. Die bei 42° gezüchteten Bouillonkulturen zeigten schon bei makroskopischer Betrachtung eine schwächere Trübung, ein schwächeres Wachstum bei dieser Temperatur war auch nach den bei Bestimmung der Kardinalpunkte gemachten Erfahrungen zu erwarten gewesen.

Versuche mit und ohne Luftzufuhr.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 10 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: 6 Wochen altes Sporenmaterial der 41. Kulturgeneration in sterilem Wasser gleichmäßig verteilt und ¼ Minute in kochendem Wasserbade erhitzt.

Impfmenge: 0,1 ccm der gut umgeschüttelten, gleichmäßig verteilten Sporenmischung.

Versuchstemperatur = 28° C.

I. Versuchsreihe. Die Kulturgefäße waren mit Watte verschlossen.

a) Nach 9-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 3,7 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 9- „ „ „ „ „ „ „ 4,7 ccm „
c) „ 12- „ „ „ „ „ „ „ 8,3 ccm „

II. Versuch. Das Kulturgefäß war mit dem Glasrohraufsatz (s. Abb. p. 75) verschlossen, die äußeren Rohrenden (Durchmesser = 0,6 cm) waren mit Watte verschlossen.

Nach 5-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 25 ccm n/Säure.

III. Versuch. Das Kulturgefäß war mit der Säurevorlage luftdicht verbunden.

Nach 9-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 17,5 ccm n/Säure.

IV. Versuch. Das Kulturgefäß war luftdicht verschlossen, ohne Verbindung mit der Vorlage.

Nach 5-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 17 ccm n/Säure.

Aus den Versuchen der I. Versuchsreihe geht hervor, daß bei Verschluß der Kulturgefäße mit Watte sehr viel Ammoniak aus den Gefäßen entweicht, eine günstige Beeinflussung infolge des nahezu uneingeschränkten Luftzutrittes durch eine Bestimmung des vorhandenen Ammoniaks nicht ermittelt werden konnte; eine Bestimmung des etwa noch unzersetzt in der Flüssigkeit enthaltenen Harnstoffs hätte darüber Aufschluß geben können, wurde aber nicht vorgenommen.

Bei Versuch II war der Luftzutritt nur durch die engen, mit Wattepfropfen verschlossenen Glasrohrenden möglich, die Spaltungsgröße eine recht hohe; sie überstieg die der folgenden Versuche, bei denen der Luftzutritt völlig abgeschlossen war. Der Anschluß an die Säurevorlage hatte keinen fördernden Einfluß auf das Spaltungsvermögen, das selbst nach längerem Stehen nicht mehr Säure gebunden wurde.

Der Zutritt der Luft zur Kulturflüssigkeit scheint also, wie aus Versuch II zu erkennen ist, einen günstigen Einfluß auszuüben. Der exakte Beweis wäre so auszuführen, daß man von einer ganz bestimmten, zahlenmäßig festgestellten Sporenmenge ausginge, mit Hilfe des Aspirators eine bestimmte Zeit keim- und ammoniakfreie Luft durch die Kulturflüssigkeit leitete und am Ende die Vermehrungs- und Spaltungsgröße bestimmte; die Resultate müßten dann noch mit denen verglichen werden, die man erhielte in Kontrollkulturen, welche ohne Luftzutritt, aber unter sonst ganz gleichen Bedingungen gezüchtet worden wären.

Quantitative Versuche mit Ermittlung der Vermehrungsgröße.

Einfluß der Züchtung auf Harnstoff-freiem und 2 Proz. Harnstoff-haltigem Nährboden.

Zu diesen Versuchen wurden gleiche Sporenmengen der 19. Kulturgeneration benutzt, die aus einer Spore hervorgegangen waren und in dem einen Falle auf ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Ammonkarbonat und in dem anderen Falle auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff gezüchtet worden waren; die Sporen,

die in beiden Fällen einen durchaus gesunden Eindruck machten, wurden in Harnstoffbouillon geimpft und nach gleichen Zeiten sowohl die Spaltungsgröße, als auch die Keimzahl bestimmt.

Der Zählung der Stäbchen wurden in dieser Versuchsreihe die durchschnittliche Länge einzelliger Oidien zugrunde gelegt; die unseptierten Fäden wurden nach der durchschnittlichen Länge der im gleichen Präparate vorkommenden Stäbchen gemessen.

1. Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 19., auf ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Ammonkarbonat (Ammon-Agar) erwachsenen Kulturgeneration.

Sporenzählung.

Zählmischung + Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung 1
Verdünnung 1 = 5.

Zählung der Mischung 2:
1. Auf 80 Quadrate kamen 26 Sporen,
2. „ 80 „ „ 26 „
Resultat: „ 160 „ „ 52 „
„ 1 „ „ 0,325 Sporen,
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,325 . 4 Millionen = 1,3 Millionen,
„ 1 ccm „ „ 1 „ 6,5 Millionen Sporen.

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchsdauer: 47 Stunden; Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 6,5 Millionen Sporen.

a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
+ 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm. der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt: 15 ccm n/H_2SO_4.
Zur Neutralisation waren nötig: 4,4 ccm n/KOH.
20 ccm ster. 2proz. Harnstoffbouillon erfordern: 0,2 ccm n/H_2SO_4.
Nach 47 Stunden waren also gebunden 10,4 ccm n/H_2SO_4 = 0,312 g H.
= 1,56 Proz. H.
= 78 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung: 1 = 15.
Zählung 1: Auf 60 Quadrate kamen 99 Stäbchen.
„ 2: „ 40 „ „ 67 „
Resultat: „ 100 „ „ 166 „
„ 1 „ „ 1,66 Stäbchen,
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,66 . 4 Millionen,
„ 1 ccm „ „ B „ 6,64 Millionen Stäbe,
„ 1 ccm „ „ A „ 90,6 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 3586 Millionen Stäbe.

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:
Nach 47 Stunden waren gebildet aus 6,5 Millionen Sporen: 3586 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon: 1,56 Proz. = 78 Proz. der zugesetzten Menge.

2. Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 19., aus einer einzelnen Spore gezüchteten und auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff kultivierten Kulturgeneration.

Sporenzählung:

Zählmischung (Mischung 2) 1 ccm Sporenmischung (Mischung 1) + Zählzusatz. Verdünnung 1 : 5.

Zählung der Mischung 2.
„ 1: Auf 100 Quadrate kamen 57 Sporen,
„ 2: „ 20 „ „ 9 „
Resultat: „ 120 „ „ 66 „
„ 1 „ „ 0,33 Sporen,
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,33 . 4 Millionen.
„ 1 ccm „ „ 2 „ 1,32 Millionen Sporen,
„ 1 ccm „ „ 1 „ 6,6 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchsdauer 47¼ Stunden; Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung = 6,6 Millionen Sporen.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit, wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt: 15 ccm n/H_2SO_4.
Zur Neutralisation waren nötig: 3,6 ccm n/KOH.
20 ccm ster. 2proz. Harnstoffbouillon erfordern: 0,2 ccm n/H_2SO_4.
Nach 47¼ Stunden waren also gebunden: 11,2 ccm n/H_2SO_4 = 0,336 g Harnstoff
= 1,68 % „
= 84 % der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.

Mischung B: Verdünnung 1 : 15, wie in Versuch 1 b.
Zählung 1: Auf 60 Quadrate kamen 122 Stäbchen,
„ 2: „ 40 „ „ 74 „
Resultat: „ 100 „ „ 196 „
„ 1 „ „ 1,96 „
„ 1 ccm der Mischung B: 1,96 . 4 Millionen,
„ 1 ccm „ „ A: 1,96 . 4 . 15 = 117,6 Millionen,
„ 36 ccm „ „ A: 4234 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b.

Nach 47¼ Stunden waren gebildet aus 6,6 Millionen Sporen: 4234 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon: 1,68 Proz. = 84 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat: In den Versuchen 1 a und 1 b waren bei fast gleicher Impfmenge und Versuchszeit unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nur 3586 Millionen einzelliger Oidien gebildet und 1,56 Proz. = 78 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge gespalten. Es scheint aus den ganzen Versuchen hervorzugehen, daß die auf harnstoffhaltigen Nährböden gezüchteten Sporen besser angepaßt sind an Harnstoff, deshalb sich schneller vermehren als die auf harnstoffreiem Nährboden gezüchteten, und ihre Kulturen deshalb auch in der Zeiteinheit ein stärkeres Wachstum aufweisen.

Es scheint auch, daß die größere Harnstoffspaltung eben durch diese stärkere Zellvermehrung zu erklären ist und daß das Vermögen der Harnstoffspaltung durch die Züchtung auf harnstoffhaltigem oder harnstoffreiem Nährboden nicht beeinflußt wird.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von verschieden langer Fortzüchtung auf harnstoffreien Nährböden.

Zur Ausführung dieses Versuches wurden Sporen der 21. und 101. auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturgeneration in Harnstoffbouillon geimpft und nach gleichen Zeiten sowohl die Spaltungsgröße als auch die Keimzahl bestimmt.

1. Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. Kulturgeneration von Bac. probatus.

Sporenzählung.

Zählmischung = Mischung 2. 1 ccm der Sporenmischung (1) dieser Versuchsreihe + Zählzusatz. Verdünnung 1 = 5.

Zählung der Mischung 2:
„ 1: Auf 100 Quadrate kamen 137 Sporen,
„ 2: „ 60 „ „ 82 „
Resultat: „ 160 „ „ 219 „
„ 1 „ „ 1,37 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 1,36 . 4 Millionen Sporen,
„ 1 ccm „ „ 2 „ 5,44 „ „
„ 1 ccm „ „ 1 „ 27,2 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur: 28° C.
Versuch a) Harnstoffspaltung.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 27,2 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 47 Stunden.

Die Mischung A bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit

36 ccm Flüssigkeit wird nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt: 15 ccm n/H_2SO_4.
Zur Neutralisation waren nötig: 2,7 ccm n/KOH.
20 ccm ster. 2proz. Harnstoffbouillon erfordern: 0,2 ccm n/H_2SO_4.
Nach 47 Stunden waren also gebunden: 12,1 ccm n/H_2SO_4 = 0,363 g Harnstoff
= 1,815 % „
= 90,75 % der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches (1 a),
Verdünnung 1 : 10.
Zählung 1: Auf 100 Quadrate kamen 164 Stäbchen,
„ 2: „ 80 „ „ 135 „
Resultat: „ 180 „ „ 299 „
„ 1 „ „ 1,66 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,66 . 4 Millionen Stäbchen,
„ 1 ccm „ „ B „ 6,64 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 132,8 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 4780 „ „

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:
Nach 47 Stunden waren gebildet aus 27,2 Millionen Sporen: 4780 Millionen Stäbchen, und in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,815 Proz. = über 90 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff gespalten.

2. Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 101. Kulturgeneration von Bac. probatus.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1) dieser Versuchsreihe.
Verdünnung 1 = 5.

Zählung der Mischung 2:
„ 1. Auf 60 Quadrate kamen 82 Sporen
„ 2. „ 60 „ „ 77 „
Resultat: „ 120 „ „ 159 „
„ „ 1 „ „ 1,325 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 1,325 . 4 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 2 „ 5,3 „ „
„ 1 ccm „ „ 1 „ 26,5 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff. Versuchstemperatur 28° C.

Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 26,5 Millionen Sporen.

Versuchsdauer: 47¼ Stunden.

Vorgelegt wurden 15 ccm n/Schwefelsäure.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurden nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . . . 2,2 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . . . 12,8 ccm n/H_2SO_4
20 ccm ster. 2-proz. H.-Bouillon erfordern 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 47¼ Stunden waren also gebunden 12,6 ccm n/H_2SO_4 = 0,378 g Harnstoff
= 1,89% „
= 94,5% der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 2b. Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 2a + Zählzusatz.
Verdünnung 1 = 20.

Zählung der Mischung 2.
„ 1: Auf 160 Quadrate kamen 253 Stäbchen
„ 2: „ 40 „ „ 83 „
Resultat: „ 200 „ „ 336 „
„ 1 „ „ 1,68 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,68 . 4 Millionen Stäbe
„ 1 ccm „ „ B „ 6,72 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 134,4 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 4838 „ „

Resultat der Versuche 2a und 2b:

Nach 47¼ Stunden waren gebildet aus 26,5 Millionen Sporen = 4838 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,89 Proz. Harnstoff = 94,5 Proz. des zugesetzten Harnstoffes.

Gesamtresultat beider Versuchsreihen:

a) Vermehrung.

27,2 Millionen Sporen der 21. Kulturgeneration bildeten in 47 Stunden 4780 Millionen Stäbchen.

26,5 Millionen Sporen der 101. Kulturgeneration bildeten in 47¼ Stunden 4838 Millionen Stäbchen.

b) Spaltungsgröße.

4780 Millionen Stäbchen spalteten in 2-proz. Harnstoffbouillon 1,815 Proz. Harnstoff.

4838 Millionen Stäbchen spalteten in 2-proz. Harnstoffbouillon 1,89 Proz. Harnstoff.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß das Spaltungsvermögen durch die andauernde Züchtung auf harnstoffreiem Nährboden nicht verändert wird.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Züchtung bei 42° C, dem Temperaturmaximum für Sporenbildung.

Zu den Versuchen ging ich zuerst von kräftigem Oidienmaterial der 30. Kulturgeneration auf Ammon-Agar aus, impfte dann das Material 15-mal hintereinander nahezu täglich bei 42°, der Maximaltemperatur für die Sporenbildung, auf Ammon-Agar über. Bei dieser Temperatur wurde die Entwicklung geschwächt und wurden nur wenig Sporen ausgebildet; die Sporenbildung trat nachträglich, wenn die Kulturen bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, wieder reichlicher ein.

Versuchsmaterial: Sporen der 45. zuerst bei 28°, später bei 42° C gezüchteten Kulturgeneration auf Ammon-Agar.

Versuch a). Sporenzählung.
Zählmischung (2): 1 ccm der Sporenmischung (1)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 5.
Resultat der Zählung:
Auf 160 Quadrate kamen 82 Sporen
„ 1 „ „ 0,512 „
„ 1 ccm der Zählmischung „ 0,512 . 4 = 2,048 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ Sporenmischung „ 2,048 . 5 = 10,24 „ „
„ 0,975 ccm „ „ „ 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Stäbchenzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur: 28° C.
a) Harnstoffspaltung. Versuchsdauer 44 Stunden.
Impfmenge: 0,975 ccm = 10 Millionen Sporen (Sporenmischung 1).
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,975 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 35,975 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 34,975 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm zur Zählung titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . . 3,1 ccm n/KOH
20 ccm ster. 2-proz. Harnst.-Bouill. erf. 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 44 Stunden waren also gebunden 11,7 ccm n/H_2SO_4 = 0,351 g Harnstoff = 1,755 Proz. Harnstoff = 87,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch b). Stäbchenzählung.
Zählmischung (B): 1 ccm der Stäbchenmischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 26.
Resultat der Zählung:
Auf 100 Quadrate kamen 206 Stäbchen
„ 1 „ „ 2,06 „
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 2,06 . 4 = 8,24 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ Sporenmischung „ 8,24 . 26 = 2142 Millionen Sporen
Resultat der Zählung:
Auf 60 Quadrate kamen 139 Stäbchen
„ 1 „ „ 2,32 Stäbchen
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 2,32 . 4 = 9,28 Millionen
„ 1 ccm „ Stäbchenmischung „ 9,28 . 26 = 241,28 Millionen
„ 36 ccm „ „ „ 8686 Millionen Oidien (Aufteilung in Septen)
„ 36 ccm „ „ „ 4343 Millionen Oidien (Aufteilung in 1-lange)

Endresultat: Nach 44 Stunden waren aus 10 Millionen Sporen 4343 Millionen Stäbchen entstanden und in 2 Proz. Harnstoffbouillon gespalten 1,755 Proz. Harnstoff = 87,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Da dieses Resultat der Spaltungs- und Vermehrungsgröße mit den Resultaten der anderen Versuche (siehe die Tabelle X) durchaus übereinstimmt, kann von einer Schwächung des Harnstoffspaltungsvermögens durch Züchtung der Kultur bei 42° C nicht die Rede sein, auch die Entwicklungskraft ist nicht verändert.

Tabelle X.

Versuchsmaterial	Sporenimpfmenge in Mill.	Versuchsdauer in Std.	Gespalten von 2% Harnstoff %	Stäbchenzahl in Mill.	Art der Zählung
St. A. 19 Kg. aus 1 Spore auf Ammon-Agar . .	6,5	47	78	3586	durchschnittliche Länge einzelliger Oidien
St. A. 19 Kg. aus 1 Spore auf 2% Harnstoff-Agar	6,6	47¼	84	4234	
St. A. 21 Kg. aus 1 Kolonie auf Ammon-Agar . .	27,2	47	90,75	4780	ein-lange Oidien
St. A. 101 Kg. aus 1 Kolonie auf Ammon-Agar	26,5	47¼	94,5	4838	„
St. A. 45 Kg. (15 G. bei 42°) auf Ammon-Agar . .	10	44	87,5	4343	„

Aus den Versuchen ergibt sich, daß die Größe der Harnstoffspaltung von Kulturverhältnissen wie auch von Impfverhältnissen abhängig ist.

A. Kulturverhältnisse. Einen Einfluß auf die Spaltungsgröße übten aus:
a) die Zusammensetzung der Kulturlösung,
b) die Versuchsdauer,
c) die Versuchstemperatur,
d) Luftzufuhr (?).

B. Impfverhältnisse. Einen Einfluß übten aus:
a) Entwicklungszustand des Impfmaterials,
b) Menge des Impfmaterials.
Keinen Einfluß auf die Spaltungsgröße übten aus:
c) Gleichlange Züchtung auf Harnstoff-haltigem und Harnstoff-freiem Nährboden,
d) verschieden lange Züchtung auf Harnstoff-freiem Nährboden,
e_1) Züchtung eines Stammes unter bestimmten Bedingungen aus Kolonien,
e_2) Züchtung eines Stammes unter den gleichen Bedingungen aus einer einzelnen Spore,
f_1) Züchtung eines Stammes bei 28° C, dem Temperaturoptimum für Sporenbildung,
f_2) Züchtung desselben Stammes bei 42° C, dem Temperaturmaximum für Sporenbildung.

Da sich nun herausstellte, daß die die Größe der Harnstoffspaltung beeinflussenden Faktoren auch das Wachstum, d. h. die Vermehrungsgröße mindestens in annähernd gleichem Maße günstig oder ungünstig beeinflussen, so ergibt sich schon daraus, daß die Größe der Harnstoffspaltung im wesentlichen abhängig ist von der Vermehrungsgröße. Die Resultate der folgenden wie auch die der später (p. 117—133) mit den verschiedenen Stämmen unternommenen umfangreichen Versuche zeigen diese Abhängigkeit ganz deutlich.

Spezielle Versuche über die Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Vermehrungsgröße.

I. Versuchsreihe.

Sporenzählung.

Hauptversuch, durch den die zahlenmäßige Menge des Impfmaterials bestimmt wurde, das zur Feststellung der Harnstoffspaltungsgröße Verwendung fand.

Versuchsmaterial: Bac. probatus, ausgereiftes Sporenmaterial der 41., auf Ammon-Agar gewachsenen Kulturgeneration.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1) + 1 ccm Kupferoxydammoniak
Mischung 3: 1 ccm „ „ (1) + 1 ccm H_2SO_4 (5 Proz.)

Zählung der Mischung	2:	Auf	20	Quadrate	kamen	26	Sporen	
„ „ „	2:	„	20	„	„	26	„	
„ „ „	2:	„	20	„	„	28	„	
„ „ „	3:	„	20	„	„	29	„	
Resultat:		„	80	„	„	111	„	
„		„	1	„	„	1,3875	Sporen	
„		„	1	ccm	„	1,3875 . 4	Millionen	Sporen
„		„	1	ccm	„	5,55	Millionen	Sporen
„ bzgl. d. Mischg. 1		„	1	ccm	„	11,1	„	„

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Harnstoffspaltung = Bestimmung der Harnstoffspaltungsgröße in bestimmten Zeitabständen.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Bac. probatus, abgekochtes Sporenmaterial der Sporenmischung (1) des 1. Hauptversuches, angestellt mit Sporen der 41. Kulturgeneration.

Versuchstemperatur: 28° C.

Versuch 1a.

Impfmenge: 0,5 ccm der Sporenmischung (1) = 5,55 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 20 Stunden.
Vorgelegt wurden: 10 ccm n/H_2SO_4.
Die Impfmenge betrug 0,5 ccm der Sporenmischung (1) = 5,55 Millionen Sporen.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
0,5 ccm Impfmaterial
10 ccm Säure
= 30,5 ccm
wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Keimzählung Verwendung fand, titriert.

Titrierflüssigkeit	29,5	ccm
Davon wurden vorgelegt	10,00	ccm n/H_2SO_4
Es wurden erfordert	8,3	ccm n/KOH
Es sind verbraucht	1,7	ccm n/H_2SO_4
20 ccm steril. Bouill. erforderten .	0,2	ccm n/H_2SO_4

Nach 20 Stunden wurden gebunden 1,5 ccm n/H_2SO_4 = 0,045 g Harnstoff
= 0,225 Proz. Harnstoff
= 11,25 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge

Keimzählung = Bestimmung der in gewissen Zeitabständen gebildeten Stäbchenzahl.

Versuch 1 b.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 1 a,
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak.

Zählung 1:	Auf	20	Quadrate	kamen	121	Stäbchen		
„ 1:	„	20	„	„	120	„		
„ 2:	„	20	„	„	121	„		
Resultat:	„	60	„	„	362	„		
„	„	1	„	„	6,03	„		
„	„	1 ccm	der Mischung	B	kamen	6,03 . 4	Millionen	Stäbchen
„	„	1 ccm	„	„ B	„	24,12	„	„
„	„	1 ccm	„	„ A	„	48,24	„	„
„	„	30,5 ccm	„	„ A	„	1471	„	„

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b.

Nach 20 Stunden waren gebildet aus 5,55 Millionen Sporen 1471 Millionen Stäbchen, und nach 20 Stunden waren gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,225 Proz. Harnstoff.

Versuch 2 a.
Impfmenge: 1,0 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Mill. Sporen.
Versuchsdauer: 23 Stunden.
Vorgelegt wurden: 10 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 31 ccm Flüssigkeit,
wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Keimzählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt:	10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation wurden erfordert:	7,2 ccm n/KOH
Zur Bindung des entwickelten NH_3 waren demnach verbraucht:	2,8 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile Harnstoffbouillon erforderten:	0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 23 Stunden waren also gebunden:	2,6 ccm n/H_2SO_4 = 0,078 g Harnstoff = 0,39 Proz. Harnstoff = 19,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 2 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 2 b.
+ 1 ccm 20-proz. Kalilauge.

Zählung 1:	auf	20	Quadrate	kamen	134	Stäbchen		
„ 1:	„	20	„	„	144	„		
„ 2:	„	20	„	„	142	„		
Resultat:	„	60	„	„	420	„		
„	„	1	„	„	7	„		
„	„	1 ccm	der Mischung	B	kamen	7 . 4	Millionen	Stäbchen
„	„	1 ccm	„	„ B	„	28	„	„
„	„	1 ccm	„	„ A	„	56	„	„
„	„	31 ccm	„	„ A	„	1736	„	„

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 23 Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 1736 Millionen Stäbchen, und nach 23 Stunden waren gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,39 Proz. Harnstoff.

Versuch 3 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 45½ Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . .	15 ccm n/H_2SO_4	
Zur Neutralisation wurden erfordert .	5,9 ccm n/KOH	
Verbraucht waren demnach	9,1 ccm n/H_2SO_4	
20 ccm sterile Harnstoffbouillon erfordern	0,2 ccm n/H_2SO_4	
Nach 45½ Stunden waren also gebunden	8,9 ccm n/H_2SO_4	= 0,267 g Harnstoff = 1,335 Proz. Harnstoff = 66,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 3 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 3 a.
+ 1 ccm 20-proz. Kalilauge.

Zählung 1:	Auf	20	Quadrate	kamen	116	Stäbchen	
„ 1:	„	20	„	„	120	„	
„ 1:	„	20	„	„	124	„	
„ 2:	„	20	„	„	126	„	
Resultat:	„	80	„	„	486	„	
„	„	1	„	„	6,075	„	
Resultat:	Auf	1	ccm der Mischung	B	kamen	6,075.4	Millionen Stäbchen
	„	1	ccm „	„	B „	24,3	„ „
	„	1	ccm „	„	A „	48,6	„ „
„	„	36	ccm „	„	A „	1750	„ „

Endresultat der Versuche 3 a und 3 b:
Nach 45½ Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 1750 Millionen Stäbchen, und nach 45½ Stunden waren gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,335 Proz. Harnstoff.

Die niedrige Keimzahl = 1750 Stäbchen nach 45½ Stunden wird durch folgende Beobachtungen erklärlich: Es waren viele, z. T. recht lange Fäden vorhanden, die meist weder Zelligkeit noch Stäbigkeit zeigten und deshalb als ein einzelnes Stäbchen gezählt wurden; es hatte zwar nahegelegen, die Fäden durch die Normalgröße der Oidien oder durch die einfache bis doppelte Sporangiengröße zu teilen, ich habe aber aus Gründen, die bei der Beschreibung der Zählmethode näher angeführt sind, davon abgesehen.

Versuch 4 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 46½ Stunden.
Vorgelegt wurden: 25 ccm n/H_2SO_4; das in besonderer Vorlage entwickelte NH_3 wurde durch einen Luftstrom in die Säure-Vorlage übergetrieben.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
= 21 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 20 ccm Versuchsflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, mit Alkohol und überschüssigem Alkali versetzt, das entwickelte NH_3 dann durch einen Luftstrom in die Säure-Vorlage übergetrieben.

Im Überschuß waren vorgelegt . . 25 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation wurden erfordert 16 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 9 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 46½ Stunden waren also gebunden . . . . . 8,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,264 g Harnstoff
= 1,32 Proz. Harnstoff
= 66 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge

Versuch 4 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 4 a.
+ 1 ccm Methylenblaulösung (1 + 10).
Zählung 1: Auf 20 Quadrate kamen 297 Stäbchen
„ 2: „ 20 „ „ 307 „
Resultat: „ 40 „ „ 604 „
„ „ 1 „ „ 15,01 „
„ „ 1 ccm der Mischung B kamen 15,01 . 4 Millionen Stäbchen
„ „ 1 ccm „ „ B „ 60,04 „ „
„ „ 1 „ „ A „ 120,08 „ „
„ „ 21 ccm „ „ A „ 2522 „ „

Endresultat der Versuche 4 a und 4 b:

Nach 46½ Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 2522 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,32 Proz. Harnstoff.

Die Spaltungsgröße = 1,32 Proz. Harnstoff in 46½ Stunden ist geringer als die in Versuch 3 beobachtete, was folgende Ursache hat: Bei der im Versuch 4 a gewählten Anordnung mußte das Kulturgefäß zur Entnahme des Zählungs-Kubikzentimeters geöffnet werden; die dabei eingetretene Verdunstung von NH_3 macht sich am Endresultate deutlich bemerkbar.

Versuch 5 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 47 Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der znr Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation wurden erfordert 5,35 ccm n/KOH
Verbraucht wurden demnach . . . 9,65 ccm n/H_2SO_4
20 ccm 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 47 Stunden waren also gebunden . . . . . 9,45 ccm n/H_2SO_4 = 0,2835 g Harnstoff
= 1,4175 Proz. Harnst.
= 70,9 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 5 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung des Versuches 5 a.
+ 1 ccm 20-proz. Kalilauge.
Zählung 1: Auf 20 Quadrate kamen 150 Stäbchen
„ 1: „ 20 „ „ 153 „
„ 2: „ 20 „ „ 150 „
Resultat: „ 60 „ „ 453 „
„ „ 1 „ „ 7,55 „

Resultat: Auf 1 ccm der Mischung B kamen 7,55 . 4 Millionen Stäbchen
„ „ 1 ccm „ „ B „ 30,2 „ „
„ „ 1 ccm „ „ A „ 60,4 „ „
„ „ 36 ccm „ „ A „ 2174 „ „

Endresultat der Versuche 5 a und 5 b:
Nach 47 Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 2174 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,4175 Proz. Harnstoff.

Versuch 6 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 60 Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit
wurde nach kräftigem Schütteln und Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt: . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation wurden benötigt 3,9 ccm n/KOH
Verbraucht wurden demnach . . . 11,1 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 60 Stunden waren also gebunden . . . . . 10,9 ccm n/H_2SO_4 = 0,327 g Harnstoff
= 1,635 Proz. Harnstoff
= 81,8 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 6 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 6 a.
+1 ccm 20-proz. Kalilauge.
Zählung 1: Auf 20 Quadrate kamen 179 Stäbchen
„ 1: „ 20 „ „ 185 „
„ 2: „ 20 „ „ 182 „
Resultat: Auf 60 Quadrate kamen 546 Stäbchen
„ 1 „ „ 9,1 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 9,1 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 36,4 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 72,8 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 2621 „ „

Endresultat der Versuche 6 a und 6 b:
Nach 60 Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 2621 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,635 Proz. Harnstoff.

II. Versuchsreihe.
Versuchsmaterial: Bac. probatus, ausgereiftes Sporenmaterial der 41., auf Ammon-Agar gewachsenen Kulturgeneration.

Sporenzählung.
Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1) dieser Versuchsreihe.
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak.
Zählung der Mischung 2: Auf 400 Quadrate kamen 718 Sporen
„ „ „ 2: „ 20 „ „ 38 „
„ „ „ 2: „ 20 „ „ 40 „
„ „ „ 2: „ 20 „ „ 38 „
Resultat: „ 460 „ „ 834 „
„ 1 „ „ 1,813 Sporen

	Auf	1 ccm	kamen	1,813 . 4	Millionen Sporen
	„	1 ccm	„	7,252	„ „
Resultat bzgl. d. Misch. 1	„	1 ccm	„	14,5	„ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Bac. probatus, abgekochtes Sporenmaterial der Sporenmischung (1) der 2. Versuchsreihe, angestellt mit Sporen der 41. Kulturgeneration.

Versuchstemperatur: 28° C.

Versuch 1 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 15 Stunden.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt .	5	ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . .	4,8	ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . .	0,2	ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2proz. Harnstoffbouillon erfordern	0,2	ccm n/H_2SO_4

Nach 15 Stunden war also keine Säure gebunden, d. h. es war noch keine meßbare Menge NH_3 entwickelt.

Versuch 1 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 1 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 5.
Zählung: Auf 25 Quadrate kamen 71 Stäbchen

Resultat:	„ 1	„	„	2,84	„
	„ 1 ccm der	Mischung	B	kamen 2,84 . 4	Millionen Stäbchen
	„ 1 ccm	„	B	„ 11,36	„ „
	„ 1 ccm	„	A	„ 56,8	„ „
	„ 26 ccm	„	A	„ 1477	„ „

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 15 Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 1477 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon nicht nachweisbare Mengen Harnstoff.

Versuch 2 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 20 Stunden.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt .	5	ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . .	4,5	ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . .	0,5	ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2proz. Harnstoffbouillon erfordern	0,2	ccm n/H_2SO_4

Nach 20 Stunden waren also gebunden . . . . . 0,3 ccm H_2SO_4 = 0,009 g Harnstoff
= 0,045 Proz. Harnstoff
= 2,25 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 2 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 2 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 5.

Zählung: Auf 25 Quadrate kamen 76 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 3,04 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 3,04 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 12,16 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 60,80 „ „
„ 26 ccm „ „ A „ 1581 „ „

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:
Nach 20 Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 1581 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,045 Proz. Harnstoff.

Versuch 3 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 25 Stunden.
Vorgelegt wurden: 10 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung B, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 31 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 30 ccm Titrierflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 7,4 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 2,6 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 25 Stunden waren also gebunden . . . . . 2,4 ccm n/H_2SO_4 = 0,072 g Harnstoff
= 0,36 Proz. Harnstoff
= 18 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 3 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 3 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 7.

Zählung	1:	auf	20	Quadrate	kamen	31 Stäbchen
„	1:	„	20	„	„	40 „
„	1:	„	20	„	„	37 „
„	1:	„	20	„	„	36 „
„	1:	„	20	„	„	46 „
„	1:	„	20	„	„	37 „
„	1:	„	20	„	„	46 „
„	1:	„	20	„	„	32 „
„	2:	„	20	„	„	36 „
„	2:	„	20	„	„	43 „
„	2:	„	20	„	„	37 „
„	2:	„	20	„	„	49 „
„	2:	„	20	„	„	45 „
„	2:	„	20	„	„	47 „
„	2:	„	20	„	„	37 „
„	2:	„	20	„	„	47 „

Resultat: Auf 320 Quadrate kamen 645 Stäbchen
„ 1 „ „ 2,01 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 2,01 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 8,04 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 56,28 „ „
„ 31 ccm „ „ A „ 1735 „ „

Endresultat der Versuche 3 a und 3 b:

Nach 25 Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 1735 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. ster. Harnstoffbouillon 0,36 Proz. Harnstoff.

Versuch 4 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 41¾ Stunden.
Vorgelegt wurden: 10 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung B, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
\+ 1 ccm Impfmaterial
\+ 10 ccm Säure
= 31 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 30 ccm Titrierflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 1,5 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 8,5 ccm n/H_2SO_4
20 ccm 2proz. steriler Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 41¾ Stunden waren also gebunden . . . . . 8,3 ccm n/H_2SO_4 = 0,249 g Harnstoff
= 1,245 Proz. Harnstoff
= 62,25 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 4 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 4 a.
\+ Zählzusatz
Verdünnung: 1 = 5.
Zählung 1: Auf 400 Quadrate kamen 1758 Stäbchen
„ 2: „ 20 „ „ 79 „
Resultat: „ 420 „ „ 1837 „
„ 1 „ „ 4,37 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 4,37 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 17,48 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 87,4 „ „
„ 31 ccm „ „ A „ 2710 „ „

Endresultat der Versuche 4 a und 4 b:

Nach 41¾ Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 2710 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,245 Proz. Harnstoff.

Versuch 5 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 46¼ Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
\+ 1 ccm Impfmaterial
\+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 4 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 11 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 46¼ Stunden waren also gebunden . . . . . 10,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,324 g Harnstoff
= 1,62 Proz. Harnstoff
= 81 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 5 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 5 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 15.

Zählung 1: Auf 400 Quadrate kamen 707 Stäbchen
„ 2: „ 20 „ „ 35 „
Resultat: „ 420 „ „ 742 „
„ 1 „ „ 1,766 Stäbchen
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,766 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 7,06 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 7,06 . 15 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 106 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 3816 „ „

Endresultat der Versuche 5 a und 5 b:

Nach 46¼ Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 3800 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,62 Proz. Harnstoff.

Versuch 6 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 49½ Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,
wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 4,1 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 10,9 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 49½ Stunden waren also gebunden . . . . . 10,7 ccm n/H_2SO_4 = 0,321 g Harnstoff
= 1,605 Proz. Harnstoff
= 80 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 6 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 6 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 15.

Zählung: Auf 25 Quadrate kamen 44 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 1,76 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,76 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 7,04 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 7,04 . 15 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 1056 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 3802 „ „

Endresultat der Versuche 6 a und 6 b:
Nach 49½ Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 3802 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,60 Proz. H.

Gesamtresultat.

Tabelle XI.

Versuchsmaterial	Sporenimpfmenge in Mill.	Versuchsdauer in Std.	Gespalten von 2% Harnstoff %	Stäbchenzahl in Mill.	Art der Zählung
I. Versuchsreihe.					
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	5,5	20	11,25	1471	zellige u. fädige Oidien
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	23	19,5	1736	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	45½	66,75	1750	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	46½	66	2522	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	47	70,9	2174	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	60	81,8	2621	„
II. Versuchsreihe.					
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	15	0	1477	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	20	2,25	1581	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	25	18	1735	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	41¾	62,25	2710	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	46¼	81	3816	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	49½	80	3802	„

(siehe auch Fig. 1 u. 2 der Kurventafel p. 128.)

Kapitel 10.

Beschreibung der mir übermittelten Originalkulturen. Vergleich mit meinem Originalstamm.

Beschreibung der mir von anderen Autoren übermittelten Originalkulturen und ihr Vergleich mit dem von mir isolierten Stamme.

Ich habe mich bemüht, alle in der Natur aufgefundenen und beschriebenen Arten mit Harnstoffspaltungsvermögen zu erhalten, um sie untereinander und auch mit dem von mir isolierten Harnstoffspalter zu vergleichen.

Von den als nicht sporenbildend in der Literatur beschriebenen Harnstoffbakterien erhielt ich folgende Kulturen: Bacillus erythrogenes, B. Kirchneri, B. lipsiense = Originalstämme Löhnis; B. erythrogenes = Originalstamm Söhngen, Micrococcus

candicans Flügge (Originalstamm); Bacillus a—e = Originalstämme Christensen; Urobacillus Miquelii Beijerinck (Král).

Da es mir weder gelang, in den Kulturen Sporen zu finden, noch mir möglich war, durch Fortzüchtung auf günstigen Nährböden Sporen zu erhalten, so sah ich von der Weiterbearbeitung dieser Bakterien ab.

Von den Miquelschen 60 Arten (siehe später) habe ich keine einzige erhalten können, da — wie mir der Autor freundlicherweise mitteilte — alle Kulturen eingegangen sind. Auch die von Leube und Burri isolierten Arten waren nicht mehr zu erhalten.

Von sporenbildenden Harnstoffbakterien erhielt ich eine Originalkultur des von Beijerinck isolierten „Urobacillus pasteurii (Miquel) Beijerinck", eine von Král weitergezüchtete Kultur des Beijerinckschen Originalstammes von „Urobac. leubei Beijerinck", eine von Löhnis weitergezüchtete Kultur des von Král bezogenen Beijerinckschen Originalstammes: Urobac. pasteurii (Miquel) Beijerinck und schließlich Kulturen der Stämme: 1. A_{4a}, 2. B_2, 3. B_3 des von Löhnis isolierten „Bacillus Pasteuri (Miquel) Migula" und Kulturen der Stämme I und III des von Löhnis isolierten „Bacillus Freudenreichii (Miquel) Migula".

Die mir von Beijerinck und Král übermittelten Kulturen enthielten genügend Sporen; dagegen waren die mir von Löhnis übersandten Kulturen durch ungünstige Umstände, wie mir Herr Prof. Löhnis brieflich mitteilte, stark geschwächt worden: Der Stamm B_2 des „Bac. Pasteuri" enthielt gar keine Sporen, es gelang mir auch nicht, ihn zur Sporenbildung zu bringen. Die anderen Stämme enthielten nur ganz vereinzelt Sporen; eine Abkochung des Sporenmaterials bei der Umimpfung zur Stärkung des Sporenbildungsvermögens habe ich bald unterlassen, da diesbezügliche Versuche (siehe auch p. 10) keine Vorteile boten. Dagegen gelang es mir durch längere, fast tägliche Strichüberimpfung ganz jungen Oidienmaterials dieser Stämme auf günstige Nährböden (siehe weiter unten) diese so zu kräftigen, daß genügend Sporen ausgebildet wurden; am wenigsten kräftig blieb der Stamm A_{4a}, Stäbchen und Sporen waren sehr klein und Sporen in so geringer Zahl, daß ich von der Festlegung einer Kurve für die Sporengröße und von der Bestimmung der Harnstoffspaltungsgröße absehen mußte.

Um die mir übermittelten Kulturen mit meinem Harnstoffspalter vergleichen zu können, habe ich sie der eingangs geschilderten „allgemeinen Vorbehandlung" unterworfen; ich brachte die Kulturen auf drei verschiedene Nährböden:

1.	⅓ D-Agar	+	0,2	Proz.	Ammoniumkarbonat	+	0,1	Proz. Natriumkarbonat
2.	⅓ „	+	0,2	„	Harnstoff	+	0,1	„ „
3.	⅓ „	+	2	„	„	+	0,1	„ „

und züchtete sie durch meist tägliche Überimpfung auf diesen Nährböden mindestens 4 Wochen lang fort. Die genannten Nährböden hatten sich von den vielen mit zur Kultur herangezogenen Nährböden (siehe p. 6) am besten bewährt.

Der Vergleich der „normal vorbehandelten" Kulturen untereinander und mit meinem Originalstamm erstreckte sich zunächst auf ihr makroskopisches und ihr mikroskopisches Aussehen.

Kulturelle Eigenschaften.

Das Kulturbild der verschiedenen Stämme war durchaus einheitlich und entsprach auch dem meines Originalstammes. Der Beijerincksche Originalstamm wuchs auf den harnstoffhaltigen Nährböden etwas besser als auf dem harnstoffreien Ammon-Agar; der Stamm war augenscheinlich besonders an den Harnstoff angepaßt. Auf neutralen Agar- und Gelatinenährböden, die in alkalifreien Kulturröhren ausgegossen waren, fand kein Wachstum statt. Auf Kartoffel und Möhre konnte nur dann Wachstum beobachtet werden, wenn diesen Nährböden Kreide zugesetzt war; auch hier zeigte der Beijerincksche Originalstamm des „Urobac. pasteurii" das schwächste Wachstum. In völlig neutraler Bouillon oder Nährlösung I, die ebenfalls in alkalifreien Kulturröhren aufbewahrt wurde, fand kein Wachstum statt. In asparaginhaltiger M-Nährlösung (Nährlösung IV) fand auf Zusatz von Ammonkarbonat (0,5 Proz.) deutliches Wachstum statt, zumal bei Einimpfung von jungem Oidienmaterial; auf Zusatz von Dextrose (2 Proz.) wurde das Wachstum noch etwas kräftiger; am stärksten war es in Bouillon mit 1 Proz. Pepton und bis 1 Proz. Ammonkarbonat oder bis 2 Proz. Harnstoff.

Morphologische Eigenschaften.

Die Form und Größe der Sporen des Beijerinckschen „Urobac. pasteurii", wie auch des Stammes B_3 „Bac. Pasteuri" von Löhnis glichen der bei den Sporen meines Originalstammes beobachteten. Der „Urobacillus leubei" zeigte nur insofern eine geringe Abweichung, als hier mehr längliche Sporen beobachtet wurden, wie dies auch aus den Kurven zu ersehen ist. Der mir von Löhnis übermittelte Stamm des „Urobac. pasteurii Beijerinck" neigte übrigens auch dazu, längliche Sporen neben runden auszubilden.

„Bacillus Freudenreichii" hatte viel kleinere Sporen als die genannten Stämme, nur der Stamm A_{4a} Löhnis des „Bacillus Pasteuri" zeigte ähnliche Größenverhältnisse.

Zur Festlegung der Kurven für die Sporengrößen der verschiedenen Stämme wurde jeweils die 30., auf Ammon-Agar gewachsene Kulturgeneration benutzt; außerdem wurden bei einigen Stämmen (siehe unten) auch noch andere Nährböden herangezogen. Auch hier wurde bei Aufstellung der Zahlen für Sporenlänge und Sporenbreite die Größe der kugeligen Sporen in gleicher Weise berücksichtigt und zwar so, daß bei einer kugeligen Spore z. B. der Größe 0,9 μ sowohl die Länge, als auch die Breite mit 0,9 μ berechnet wurde. In dem Falle, wo die Sporen z. T. ausgesprochen länglich sind, fallen auch die Kurvenspitzen nicht zusammen (siehe die Kurvenspitze von „Urobac. leubei" Fig. 3 p. 113).

1. „Urobacillus pasteurii", Beijerincks Originalstamm = Stamm D des B. probatus A. M. et Viehoever.

A. Variationskurve für Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden 60 Sporen gemessen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:							Sporengröße kugeliger Sporen:					
Breite	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7 μ	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ
Länge	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9	1,0 μ						
Stück	1	3	4	1	5	1	1	3	9	24	2	1
Breite	0,8	0,8	08, μ									
Länge	0,9	1,0	1,0 μ									
Stück	2	2	1									

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1 μ
Breite	2	10	16	29	2	1	Stück
„	3,3	17	32	49	33	1,7	Proz.
Länge	1	3	13	29	9	4	1 Stück
	1,7	5	22	49	15	6,7	1,7 Proz.

B. Variationskurve für Sporengröße auf ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Harnstoff.

Es wurden 50 Sporen gemessen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:							Sporengröße kugeliger Sporen:						
Breite	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9 μ	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1 μ
Länge	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0 μ							
Stück	4	3	5	4	3	1	1	1	2	21	3	1	1

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1 μ	
Breite	1	5	10	28	4	1	1	Stück . 2 = Proz.
Länge	1	1	2	28	12	5	1	Stück . 2 = Proz.

C. Variationskurve für Sporengröße auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff.

Es wurden 50 Sporen gemessen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:								Sporengröße kugeliger Sporen:					
Breite	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9 μ	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ	
Länge	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1 μ						
Stück	1	7	8	6	2	2	1	1	2	15	4	1	

Größe	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1 μ	
Breite	2	16	23	7	1		Stück . 2 = Proz.
Länge	1	2	24	18	5	1	„ . 2 = „

Resultat des Wachstums auf den verschiedenen Nährböden:

Ein wesentlicher Unterschied in der Sporengröße der auf den verschiedenen Nährböden gewachsenen Kulturen konnte nicht festgestellt werden.

2. „Bacillus Pasteuri (Miquel) Migula“, Stamm B_3 Löhnis. = Stamm C des B. probatus.

A. Variationskurve für Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden gemessen 25 Sporen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:						Sporengröße kugeliger Sporen:						
Breite	0,6	0,6	0,6	0,7	0,8 μ	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ	
Länge	0,7	0,8	0,9	0,8	1,0 μ							
Stück	1	1	1	1	1	1	1	4	10	3	1	

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ		
Breite	1	4	5	11	3	1	Stück . 4 = Proz.	
Länge	1	2	5	11	4	2	„ . 4 = „	

B. Sporengröße auf Kartoffel-Kreidekultur.

Die Größe der gezeichneten Sporen betrug:

Längliche Sporen:			Kugelige Sporen:		
Breite	0,6	0,6 μ	0,5	0,7	0,8 μ
Länge	0,7	0,8 μ			
Stück	1	1	1	2	1

Resultat: Auf Kartoffel-Kreidenährboden wurden weniger und etwas kleinere Sporen ausgebildet.

3. „Urobacillus leubei“ Beijerinck (Král) = Stamm B des B. probatus.

Variationskurve der Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden gemessen 100 Sporen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:													Kugeliger Sporen:					
Breite	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9 μ	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 μ	
Länge	0,7	1,0	1,1	0,9	1,0	1,1	0,9	1,0	1,1	1,2	1,0	1,1 μ						
Stück	1	4	2	5	3	2	4	10	7	3	3	6	3	4	24	17	2	

Kurventafel No. 1.

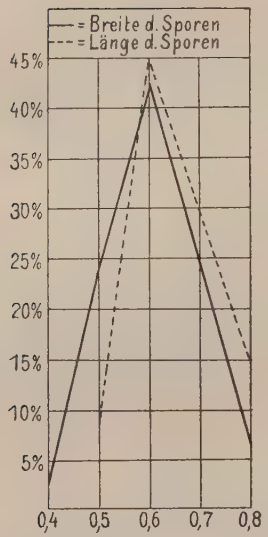


Fig. 1.
B. Freudenreichii.
1/3 D-Ag. + 0,2% Amm. carb.

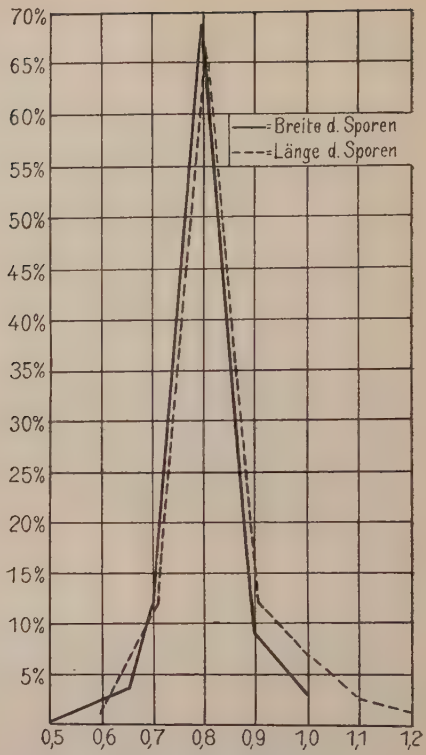


Fig. 2. Stamm A.
1/3 D-Ag. + 0,2% Amm. carb.

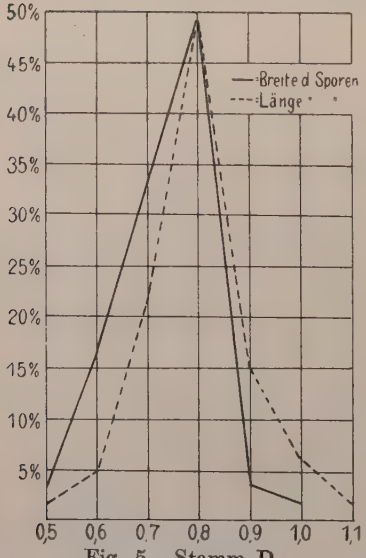


Fig. 5. Stamm D.
1/3 D-Ag. + 0,2% Amm. carb.

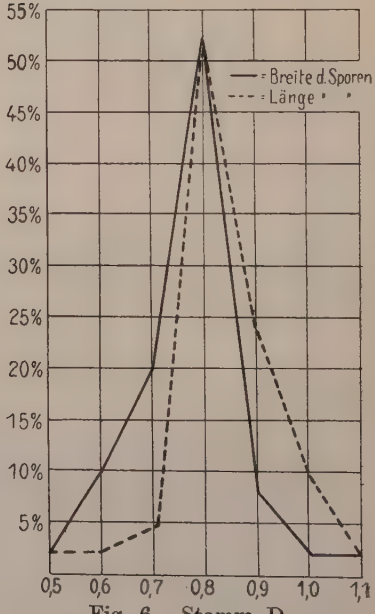


Fig. 6. Stamm D.
1/3 D-Ag. + 0,2% Harnstoff.

Kurventafel No. 1.

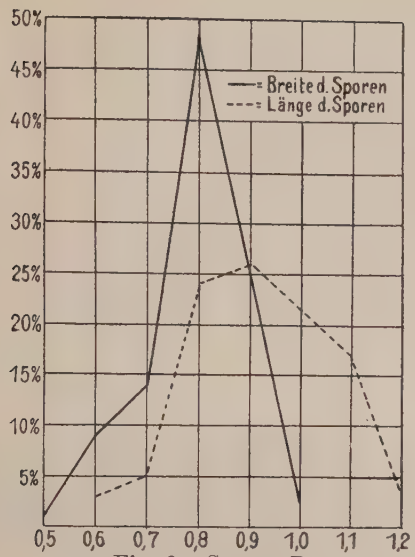


Fig. 3. Stamm B.
1/3 D-Ag. + 0,2 % Ammon. carb.

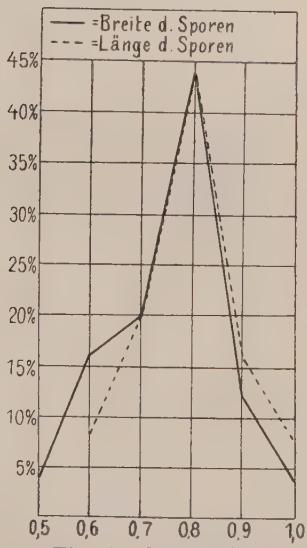


Fig. 4. Stamm C.
1/3 D-Ag. + 0,2 % Ammon. carb.

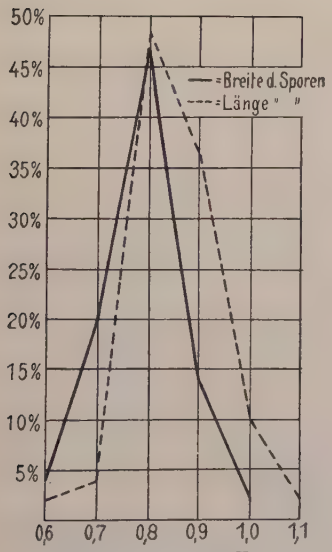


Fig. 7. Stamm D.
1/3 D-Ag. + 2 % Harnstoff.

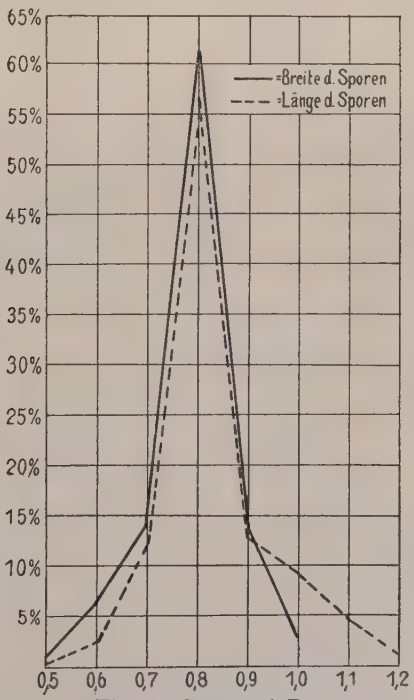


Fig. 8. Stamm A-D.
1/3 D-Ag. + 0,2 % Ammon. carb.

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	μ
Breite	1	9	14	48	26	2			Stück
Länge		3	5	24	26	22	17	3	„

4. „Bacillus Freudenreichii“ (Miquel) Migula, Stamm I Löhnis.

A. Variationskurve der Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden 33 Sporen gemessen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:							Kugeliger Sporen:			
Breite	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7 μ	0,6	0,6	0,7	0,8 μ
Länge	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7	0,8 μ				
Stück	1	1	3	1	1	2	3	13	6	2

Größe	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8 μ	
Breite	1	8	14	8	2	Stück . 3 = Proz. (annähernd)
Länge		3	15	10	5	„ . 3 = „ „

B. Sporengröße auf Kartoffel-Kreidenährboden.

Die Größe der auf diesem Nährboden beobachteten Sporen stimmte mit der auf Ammon-Agar beobachteten überein.

Die Oidien und Sporangien der Stämme, mit Ausnahme des Stammes I „Bac. Freudenreichii“ und des Stammes A_{4a} „Bac. Pasteuri“, zeigten in ihrer Größe weitgehendste Übereinstimmung mit denen meines Originalstammes; ihre Breite betrug auf Ammon-Agar meist 0,8 μ, ihre Länge meist 3 μ.

Die Oidien des „Bac. Freudenreichii“ zeigten bei einer Variationsbreite von 0,4—0,8 μ und einer Variationslänge von 1—3,6 μ und mehr meist eine Breite von 0,6 und eine Länge von 2 μ; ebenso zeigten die Sporangien meist eine Breite von 0,6 und eine Länge von 2 μ. Die Oidien und Sporangien des Stammes A_{4a} „Bac. Pasteuri“ zeigten ähnliche Größenverhältnisse.

Die Form der Sporangien war ebenso mannigfach gestaltet wie die der Sporangien meines Originalstammes. Bei dem „Urobac. pasteurii Beijerinck“ herrschte die Clostridienform vor, bei dem „Urobac. leubei Beijerinck“ waren ziemlich viele Sporen nur wenig angeschwollen, die Sporen lagen oft etwas von der Sporangienspitze entfernt.

Die bei meinem Originalstamm beobachteten Involutions-Degenerationsformen und Mikroidien traten auch in diesen Kulturen auf.

Bei allen Stämmen wurden Hemangien, wenn auch nicht so häufig wie bei meinem Originalstamme, beobachtet.

Reservestoffe wurden unter normalen Kulturbedingungen in keinem Falle nachgewiesen.

Die als Kerne angesprochenen, mit Methylenblau sich blau färbenden und mit 1-proz. Schwefelsäure sich wieder entfärbenden Körner konnten in den Oidien aller Stämme nachgewiesen werden.

Die Säure-Alkoholfestigkeit fiel bei allen Stämmen negativ aus.

Eigenbewegung wurde bei allen Stämmen beobachtet; die Geißelfärbung (nach Zettnow) wurde für „Urobac. leubei B.“ mit Erfolg durchgeführt; da Beijerinck (1901) keine gute Geißelfärbung von „Urobac. leubei“ bekam, Miquel (1904. p. 81) die Begeißelung sogar für nicht wahrscheinlich hält, bilde ich einige meiner Präparate ab (Fig. 54).

Die Chitinreaktion (siehe p. 30) wurde mit Erfolg bei allen Morphoden der Stämme „Urobac. pasteurii B.“ und „Urobac. leubei“ durchgeführt (siehe auch A. Viehoever 1912).

Tabelle XII.

Tabelle der Kardinalpunkte für Temperaturen.

	Originalstamm A (B. probatus A. M. et V.)			Stamm B (Urob. leubei B).			Stamm C (B. Pasteurii St. B_3 L.)			Stamm D (Urob. pasteurii Beij.)			B. Freudenreichii Stamm I Löhnis			B. Pasteurii Stamm A_{4a} Löhnis		
	40°	42°	44°	40°	42°	44°	40°	42°	44°	40°	42°	44°	40°	42°	44°	40°	42°	44°
Sporenkeimung	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—
Wachstum	+	+	+—	+	+	—	+	+	—	+	+	+—	+	+—	—	+	—	—
Sporenbildung	+	+	—	+	+	—	+	+—	—	+	+	—	+	—	—	+	—	—

Tabelle XIII.

Tabelle der Kardinalpunkte für Sauerstoffspannung.

	Sporenkeimung	Wachstum	Sporenbildung	Sporenkeimung	Wachstum	Sporenbildung	Sporenkeimung	Wachstum	Sporenbildung	Sporenkeimung	Wachstum	Sporenbildung	Sporenkeimung	Wachstum	Sporenbildung	Sporenkeimung	Wachstum	Sporenbildung
0 mg Sanerstoff im Liter	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 mg „ „ „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4 mg „ „ „	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
6—10 mg Sauerstoff im Liter	+	+	—+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+—	—	+	—	—
17,5—22,5 mg Sauerstoff im Liter	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Biophysikalische Merkmale.

Die Kardinalpunkte der Temperatur für Sporenkeimung, Entwicklung und Sporenbildung (siehe die Tabelle VIII) ebenso die Kardinalpunkte der Sauerstoffspannung für die genannten Entwicklungszustände (Tabelle IX), wie schließlich auch die Tötungszeiten der Sporen bei 100° C (Tabelle X) stimmen ungefähr mit den bei meinem Originalstamme beobachteten überein.

Tabelle XIV.
Tabelle der Tötungszeiten.

Im H_2O-Bad bei 100°	Originalstamm A (B. probatus A. M. et V.)	Stamm B (Urob. leubei B.)	Stamm C (B. Pasteurii St. B_3 L.)	Stamm D_2 (B. Pasteurii Beij. Král Löhn.)	Stamm D_0 (Urob. pasteurii Orig. Beij.)	B. Freudenreichii Stamm I Löhnis	B. Pasteurii St. A_{4a} Löhnis
5 Min.	+	+	+	+	+	+	
9 Min.	+	+	+				+
9¼ Min.	+	+	+	+	+		
9½ Min.	+	+		+			
10 Min.	+	+	+	+		+ —	—
10½ Min.	+						
11 Min.	+	makr. — mikr. +	+	—		—	
11½ Min.	+						
12 Min.	—	—	—	—	—	—	
12½ Min.	—						

Biochemische Merkmale.

Schwache Nitritbildung zeigten die Stämme in Nährlösung IV, die mit 1 Proz. Dextrose und 0,5 Proz. Ammonkarbonat versetzt und mit jungem Oidienmaterial geimpft worden war; das relativ stärkste Wachstum und die deutlichste Nitritreaktion zeigte „Urobac. Leubei B.“.

Die Bildung von Schleim und Riechstoffen (Trimethylamin) wurde besonders deutlich in den mit Ammonkarbonat oder Harnstoff versetzten Bouillonkulturen beobachtet.

Gasbildung fand nicht statt. Gelatineverflüssigungsvermögen war nicht bei allen Stämmen zu beobachten: So vermochten „Urobacillus Leubei“ und „Urobacillus Pasteurii Beijerinck“ Ammon-Gelatine = ⅓ D-Gelatine + 0,2 Proz. Ammonkarbonat + 0,1 Proz. Natriumkarbonat nicht zu verflüssigen. „Urobac. Pasteurii B.“ brachte Gelatine (10 Proz.) + 2 Proz. Harnstoff + 0,2 Proz. Ammonkarbonat zum Erweichen, die Gelatine rutschte in den schräg ausgegossenen und dann aufrecht aufbewahrten Kulturen zusammen, ohne verflüssigt zu werden. Der Stamm B_3 des „Bacillus Pasteurii“ (Löhnis) verflüssigte im Anfange der Kultivierung nicht alkalische Nährgelatine ohne Dextrose, nach 2-jähriger Kultivierung verflüssigte er Ammon-Gelatine ebenso stark wie mein Originalstamm. „Bacillus Freudenreichii“ und Stamm A_{4a} verflüssigten nach längerer Kultivierung auf Ammon-Agar ganz schwach die Ammon-Gelatine; nach 4 Monate langem Stehen bei durchschnittlich 17° C waren etwa ½ ccm verflüssigt.

Eine 3 Tage alte, mit kräftigen Schwärmoidien versetzte Bouillonkultur von „Urobacillus Pasteurii B.“ verursachte, zu je 1 ccm in die Halsader einer Katze und eines Kaninchens eingespritzt, keine wesentliche

Änderung des Blutungsdruckes und der Atemkurve, eine Bildung von Giftstoffen in der Bouillon hatte also nicht stattgefunden (das gleiche Ergebnis hatten ja auch Versuche mit meinem Originalstamme.

Vergleich der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgrößen.

1. Bacillus probatus A. M. et Viehoever Stamm A (Originalstamm).

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wie der nach bestimmten Zeiten daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt: der Zählung der Stäbchen wurde die Normal-Sporangiengröße zugrunde gelegt.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar gewachsenen Kulturgeneration.

a) Sporenzählung.

Mischung 2 (Zählmischung) = 1 ccm der Sporenmischung (Misch. 1)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung 2:

Resultat: Auf 400 Quadrate kamen 235 Sporen
„ 1 „ „ 0,5875 Sporen
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 0,5875 . 4 Millionen = 2,35
„ 1 ccm „ Sporenmischung „ 32,90 Millionen Sporen
„ 0,3 ccm „ „ „ 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.

Versuchstemperatur 28° C.

Impfmenge: 0,3 ccm der Sporenmischung = 10 Millionen Sporen.

1. Versuch. Versuchsdauer 20 Stunden.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,3 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 25,3 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 24,3 ccm Titrierflüssigkeit,

25,3 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm zur Zählung titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . . . 14,8 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 20 Stunden waren also noch keine nachweisbaren Mengen von Harnstoff gespalten.

b) Stäbchenzählung.

Zählmischung (Mischung B): 1 ccm der Stäbchenmischung (M. A.)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung B:

Resultat: Auf 160 Quadrate kamen 165 Stäbchen
„ 1 „ „ 1,03 „
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 1,03 . 4 Millionen
„ 1 ccm „ Stäbchenmischung „ 4,12 . 14 = 57,68 Millionen
„ 35,3 ccm „ „ „ 2037 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 20 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 2037 Millionen Stäbchen, aber in der 2-proz. Harnstoffbouillon noch keine nachweisbaren Mengen Harnstoff gespalten.

Versuch 2. Versuchsdauer 30 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,3 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 25,3 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 24,3 ccm Titrierflüssigkeit,

25,3 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm zur Zählung titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 10 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 30 Stunden waren also gebunden 4,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,144 g Harnstoff = 0,720 Proz. Harnstoff = 36 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Stäbchenzählung.

Zählmischung (B): 1 ccm der Stäbchenmischung (A)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung B.

Resultat: Auf 200 Quadrate kamen 366 Stäbchen
„ 1 „ „ 1,83 „
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 1,83 . 4 Mill. = 7,32
„ 1 ccm „ Stäbchenmischung „ 7,32 . 14 = 102,48 Mill.
„ 35,3 ccm „ „ „ 3618 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 30 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 3618 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,72 Proz = 36 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat:

Nach 20 Stunden waren rund 2000 Millionen 1-lange Oidien aus 10 Millionen Sporen gebildet, die aber noch keine nachweisbare Menge Harnstoff gespalten hatten, nach 30 Stunden waren rund 3600 Millionen Stäbchen gebildet, die 0,72 Proz. Harnstoff = 36 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge gespalten hatten.

2. Bacillus probatus A. M. et Viehoever, Stamm B (Urobacillus leubei Beijerinck, Originalstamm).

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen, wie der nach einer bestimmten Zeit daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt; der Zählung der Stäbchen wurde in der I. Versuchsreihe die Septenbildung zugrunde gelegt, in der II. Versuchsreihe die Normal-Sporangiengröße.

I. Versuchsreihe.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturgeneration.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 6.

Zählung der Mischung 2:

„ 1: Auf 100 Quadrate kamen 45 Sporen
„ 2: „ 140 „ „ 55 „

Resultat: „ 240 „ „ 100 „
„ 1 „ „ 0,417 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,417 . 4 = 1,66 Mill. Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 1,668 . 6 = 10,0 Mill. Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoffbouillon.
Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 10 Millionen Sporen.
1. Versuch. Versuchsdauer 23 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit,
26 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 3,8 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 23 Stunden waren also gebund. 1,0 ccm n/H_2SO_4 = 0,03 g Harnstoff = 0,15 Proz. Harnstoff = 7,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 8.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 80 Quadrate kamen 24 Stäbchen
„ 2: „ 60 „ „ 19 „
Resultat: „ 140 „ „ 43 „
„ 1 „ „ 0,307 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,307.4 = 1,228 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 1,228.8 = 9,824 Mill. Stäbchen
„ 26 ccm „ „ A „ 255 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:
Nach 23 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 255 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,15 Proz. Harnstoff = 7,5 Proz. der ges. Harnstoffmenge.

2. Versuch. Versuchsdauer 26 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,
36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 3 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 46 Stunden waren also gebunden 11,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,354 g Harnstoff = 1,77 Proz. Harnstoff = 77,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A + Zählzusatz. Verdünnung 1 = 15.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 400 Quadrate kamen 256 Stäbchen
„ 2: „ 160 „ „ 124 „
Resultat: „ 560 „ „ 370 „
„ 1 „ „ 0,66 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,66.4 = 2,64 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 2,64.15 = 39,6 Mill. Stäbchen
„ 36 ccm „ „ A „ 1426 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 46 Stunden waren aus 10 Millionen Sporen gebildet 1426 Millionen Stäbchen und gespalten waren in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,77 Proz. Harnstoff = 88,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

3. Versuch. Versuchsdauer 46½ Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 46¼ Std. waren also gebunden 10,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,324 g Harnstoff = 1,62 Proz. Harnstoff = 81 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A, 1 = 15 verdünnt, wie in Versuch 2 b.

Zählung der Mischung B.

Zählung 1: Auf 200 Quadrate kamen 108 Stäbchen
„ 2: „ 200 „ „ 143 „
Resultat: „ 400 „ „ 251 „
„ 1 „ „ 0,6275 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,6275.4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 15.2,51 Millionen Stäbchen
„ 36 ccm „ „ A „ 1375 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 3 a und 3 b:

Nach 46½ Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 1375 Millionen Stäbchen, gespalten waren in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,62 Proz. Harnstoff = 81 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

Gesamtresultat der Versuchsreihe I.

Nach 23 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen rund 250 Millionen Stäbchen und Fäden, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,15 Proz. Harnstoff = 7,5 Proz. der gesamten Harnstoffmenge, nach 46 Stunden über rund 1400 Millionen Stäbchen und Fäden, gespalten 1,77 Proz. = 88,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, nach 46½ Stunden in einem anderen Versuche nahezu 1400 Millionen Stäbchen und Fäden, gespalten 1,62 Proz. Harnstoff = 81 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge (Fig. 3 p. 129).

II. Versuchsreihe.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. Kulturgeneration, auf Ammon-Agar gewachsen.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung 1
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung 2:

Resultat: Auf 400 Quadrate kamen 97 Sporen
„ 1 „ „ 0,2425 Sporen
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,2425 . 4 = 0,97 Mill. Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 0,97 . 14 = 13,58 Mill. Sporen
„ 0,74 ccm „ „ 1 „ 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoffbouillon.
Versuchstemperatur 28° C.

Impfmenge: 0,74 ccm der Sporenmischung (1) = 10 Millionen Sporen.
1. Versuch. Versuchsdauer 20 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,74 ccm Impfmaterial
+ 4 ccm Säure
= 24,7 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 23,7 ccm Titrierflüssigkeit,
24,7 ccm Flüssigkeit, wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . 4 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 3,8 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 20 Stunden waren also gebunden . . . . . 0,0 ccm n/H_2SO_4 = 0,00 g Harnstoff
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A: 1 = 14 verdünnt (wie die Sporenmischung 2).
Zählung der Mischung B:
Resultat: Auf 200 Quadrate kamen 265 Stäbchen
„ 1 „ „ 1,325 Stäbchen
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,325 . 4 = 5,3 Mill.
„ 1 ccm „ „ A „ 5,3 . 14 = 74,2 Mill.
„ 24,74 ccm „ „ A „ 1834 Millionen Stäbchen

Endresultate der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 20 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 1834 Millionen Stäbchen, in 2 Proz. Harnstoffbouillon aber noch kein Harnstoff gespalten.

2. Versuch. Versuchsdauer 30 Stunden.
a) Harnstoffspaltung
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,74 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 30,74 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 29,74 ccm Titrierflüssigkeit,
30,74 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . 10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 7 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 30 Stunden waren also gebunden . . . . . 2,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,084 g Harnstoff
= 0,42 Proz. Harnstoff = 21 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 26.
Zählung der Mischung B:
Resultat: Auf 200 Quadrate kamen 198 Stäbchen
„ 1 „ „ 0,99 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,99 . 4=3,96 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 3,96 . 26=102,96 Mill. Stäbch.
„ 30,74 ccm „ „ A „ 3165 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 30 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 3165 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,42 Proz. Harnstoff = 21 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

3. Versuch. Versuchsdauer 44 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,74 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 30,74 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 29,74 ccm Titrierflüssigkeit,

30,74 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,2 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoff-bouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 44 Stunden waren also gebund. 5,6 ccm n/H_2SO_4 = 0,168 g Harnstoff = 0,84 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A: 1 = 26 verdünnt (wie die Mischung B des zweiten Versuches).

Zählung der Mischung B:

Resultat: Auf 60 Quadrate kamen 71 Stäbchen
„ 1 „ „ 1,183 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,183 . 4=4,732 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 4,732 . 26 = 23 Mill. Stäbchen
„ 30,74 ccm „ „ A „ 3782 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 3 a und 3 b:

Nach 44 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 3782 Millionen Stäbchen, gespalten waren in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,84 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

Gesamtresultat der Versuchsreihe II.

Nach 20 Stunden waren aus 10 Millionen Sporen über 1800 Millionen Stäbchen gebildet, aber noch keine deutlich nachweisbaren Mengen Harnstoff gespalten, nach 30 Stunden waren gebildet rund 3200 Millionen Stäbchen, gespalten 0,42 Proz. Harnstoff = 21 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, nach 44 Stunden waren gebildet rund 3800 Millionen Stäbchen und gespalten 0,84 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge (Fig. 4 p. 129).

3. Bacillus probatus A. M. et Viehoever, Stamm C (Stamm B_3 Löhnis des Bacillus Pasteurii (Miquel) Migula.

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wie der nach einer bestimmten Zeit daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt; der Zählung der Stäbchen wurde die Größe des Normal-Sporangiums zugrunde gelegt.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturgeneration.

Sporenzählung.
Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung 1
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.
Zählung der Mischung 2:
Zählung 1: Auf 160 Quadrate kamen 40 Sporen
„ 2: „ 40 „ „ 10 „
Resultat: „ 200 „ „ 50 „
„ 1 „ „ 0,25 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,25.4 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 0,25.4.14 = 14 Mill.Sporen
„ 0,715 ccm „ „ 1 „ 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 0,715 ccm der Sporenmischung 1 = 10 Millionen Sporen.
1. Versuch. Versuchsdauer 22 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,7 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 25,7 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 24,7 ccm Titrierflüssigkeit,
25,7 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,8 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 22 Stunden war also noch keine meßbare Menge Harnstoff gespalten.
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A = 1: 14 verdünnt, wie die Sporenmischung 2.
Zählung: Auf 100 Quadrate kamen 51 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 0,51 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,51.4 = 2,4 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 2,4.14 = 33,6 Mill. Stäbchen
„ 25,7 ccm „ „ A „ 864 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 22 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 864 Millionen Stäbchen, aber noch keine meßbare Menge Harnstoff gespalten.

2. Versuch. Versuchsdauer 47 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,7 ccm Impfmaterial
+ 9 ccm Säure
= 29,7 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 28,7 ccm Titrierflüssigkeit,
29,7 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . . 9 ccm n/H_2SO_4
Zus Neutralisation waren nötig . . . 6,3 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 47 Stunden waren also gebunden 2,5 ccm n/H_2SO_4 = 0,075 g Harnstoff = 0,375 Proz. Harnstoff = 18,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A=1 : 14 verdünnt (wie die Sporenmischung 2).
Zählung: Auf 400 Quadrate kamen 692 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 1,76 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,76.4 = 6,92 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 6,92.14 = 96,88 Mill. Stäbchen
„ 29,7 ccm „ „ A „ 2877 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 47 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 2877 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,375 Proz. Harnstoff = 18,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat:

Nach 22 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen nahezu 900 Millionen Stäbchen, aber noch keine meßbare Menge Harnstoff gespalten, nach 47 Stunden waren gebildet rund 2900 Millionen Stäbchen und gespalten

in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,375 Proz. Harnstoff = 18,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge (Fig. 7 p. 128).

4. Bacillus probatus A. M. et Viehoever, Stamm D; Stamm Urobacillus pasteuri Miquel (Beijerincks Originalstamm).

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wie der nach einer bestimmten Zeit daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt; bei der Zählung der Stäbchen wurde die Septierung und am Ende die Größe der Normal-Sporangien berücksichtigt.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar bei 28° gezüchteten Kulturgeneration.

Sporenzählung.
Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 5.
Zählung der Mischung 2:
Zählung: Auf 160 Quadrate kamen 80 Sporen
„ „ 1 „ „ 0,5 „
Resultat: „ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,5.4 = 2 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 2.5 = 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillion + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur: 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 10 Millionen Sporen.
Versuchsdauer 21 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,
36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,4 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 21 Stunden waren also gebunden 10,9 ccm n/H_2SO_4 = 0,327 g Harnstoff = 1,335 Proz. Harnstoff = 81,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.
Versuchsdauer 22 und 23 Stunden.
Nach diesen Zeiten wurden gebunden 11,5 ccm n/H_2SO_4 = 0,345 g Harnstoff = 1,725 Proz. Harnstoff = 86,1 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Versuchsdauer: 21 Stunden.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 26.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 200 Quadrate kamen 509 Stäbchen
„ 2: „ 140 „ „ 315 „
Resultat: „ 340 „ „ 824 „
„ 1 „ „ 2,45 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 2,45.4 = 9,8 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 9,8.26 = 254,8 Mill. Stäbchen
„ 36 ccm „ „ A „ 91 728 Millionen Stäbchen
Bei Berücksichtigung der Sporangiengröße = 4586 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche a und b:

Nach 21 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 4586 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,635 Proz. Harnstoff = 81,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat:

Aus 10 Millionen Sporen waren nach 21 Stunden gebildet nahezu 4600 Millionen Stäbchen und gespalten über 1,6 Proz. Harnstoff = rund 82 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, in weiteren Versuchen waren nach 22 und 23 Stunden über 1,7 Proz. Harnstoff = 86 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge gespalten.

5. Bacillus Freudenreichii (Miquel) Migula (Originalstamm I von Löhnis).

I. Versuchsreihe und II. Versuchsreihe.

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wie der nach einer bestimmten Zeit daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt; in der I. Versuchsreihe wurde der Zählung der Stäbchen die Septenbildung zugrunde gelegt; die nicht septierten Fäden wurden als 1 Stäbchen gezählt; in der II. Versuchsreihe wurde bei Zählung der Stäbchen die Sporangiengröße berücksichtigt.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturgeneration.

I. Versuchsreihe.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung 1
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 5.

Zählung der Mischung 2:

Zählung 1: Auf 120 Quadrate kamen 34 Sporen
„ 2: „ 60 „ „ 18 „
Resultat: „ 180 „ „ 52 „
„ 1 „ „ 0,29 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,29.4 = 1,16 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 1,16.5 = 5,8 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.

Versuchstemperatur:

Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 5,8 Millionen Sporen.

1. Versuch. Versuchsdauer 23 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit,

26 ccm Flüssigkeit, wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,2 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 23 Stunden waren demnach gebunden . . . . . 0,6 ccm n/H_2SO_4 = 0,018 g Harnstoff = 0,09 Proz. Harnstoff = 4,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 8.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 60 Quadrate kamen 8 Stäbchen
„ 2: „ 40 „ „ 6 „
Resultat: „ 100 „ „ 14 „
„ 1 „ „ 0,14 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,14.4 = 0,56 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 0,56.8 = 4,48 Mill. Stäbchen
„ 26 ccm „ „ A „ 116 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 23 Stunden waren gebildet aus 5,8 Millionen Sporen 116 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,09 Proz. Harnstoff = 4,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

2. Versuch. Versuchsdauer 46¾ Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 15 ccm Säure
+ 1 ccm Impfmaterial
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,
36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 9,25 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 46¾ Stunden waren gebunden 5,55 ccm n/H_2SO_4 = 0,1665 g Harnstoff = 0,8325 Proz. Harnstoff = 41,6 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 15.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 400 Quadrate kamen 104 Stäbchen
„ 2: „ 100 „ „ 25 „
Resultat: „ 500 „ „ 129 „
„ 1 „ „ 0,258 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,258.4 = 1,032 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 1,032.15 = 15,48 Mill. Stäbchen
„ 36 ccm „ „ A „ 557 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 46¾ Stunden waren gebildet aus 5,8 Millionen Sporen 557 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon rund 0,8 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat:

Nach 23 Stunden waren gebildet aus rund 6 Millionen Sporen 116 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,09 Proz. Harnstoff = 4,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, nach 46¾ Stunden nahezu 600 Millionen Stäbchen und Fäden und gespalten über 0,8 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Die niedrige Zahl der Stäbchen ist auf die Art der Berechnung in dieser Versuchsreihe zurückzuführen: Wie schon erwähnt, wurden die reichlich vorkommenden Fäden nur als 1 Stäbchen gerechnet, wenn keine Septierung (trotz Färbung) zu sehen war (Fig. 5 p. 129).

II. Versuchsreihe.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1) 1 = 5 verdünnt (wie die Mischung 2 der ersten Versuchsreihe).

Zählung der Mischung:

Zählung: Auf 100 Quadrate kamen 50 Sporen
Resultat: „ 1 „ „ 0,5 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,5.4 = 2 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 2,5 = 10 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur: 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 10 Millionen Sporen.

1. Versuch. Versuchsdauer 30 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit

26 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 3,9 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 30 Stunden waren also gebunden 0,9 ccm n/H_2SO_4 = 0,027 g Harnstoff = 0,135 Proz. Harnstoff = 6,75 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

b) Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung B:

Zählung: Auf 400 Quadrate kamen 586 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 1,465 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,465.4 = 5,86 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ A „ 5,86.14 = 84,04 Mill. Stäbchen
„ 26 ccm „ „ A „ 2133 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 30 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 2133 Millionen Stäbchen, gespalten 0,135 Proz. Harnstoff = 6,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

2. Versuch. Versuchsdauer 44 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 7 ccm Säure
= 28 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 27 ccm Titrierflüssigkeit,

28 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 7 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,1 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 44 Stunden waren also gebunden 2,7 ccm n/H_2SO_4 = 0,081 g Harnstoff = 0,405 Proz. Harnstoff = 20,25 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Kurventafel No. 2.

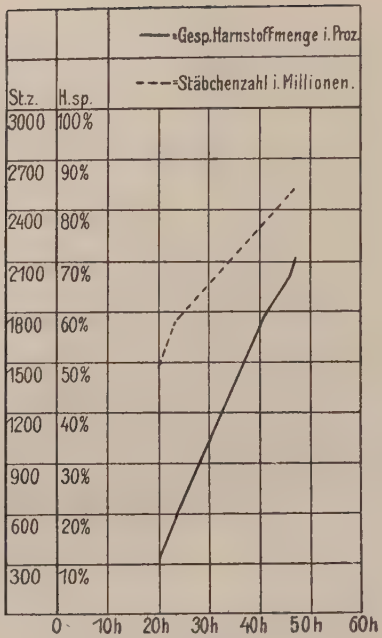


Fig. 1. Stamm A.
I. Zählversuchsreihe.

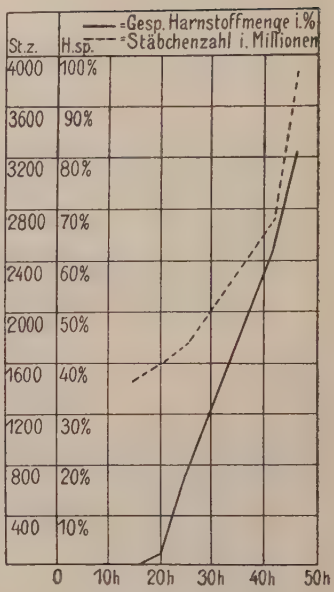


Fig. 2. Stamm A.
II. Zählversuchsreihe.

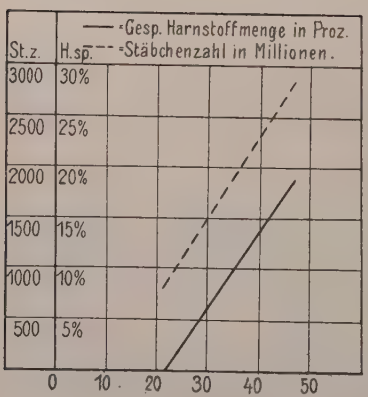


Fig. 7. Stamm C.

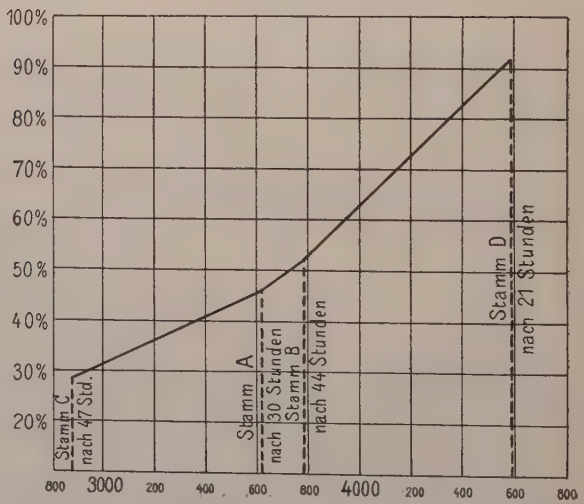


Fig. 8. Verhältnis der Harnstoffspaltungsgröße zur Vermehrungsgröße.

Kurventafel No. 2.

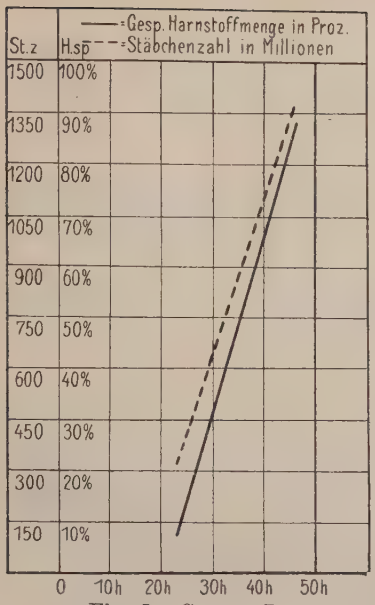


Fig. 3. Stamm B.
I. Zählversuchsreihe.

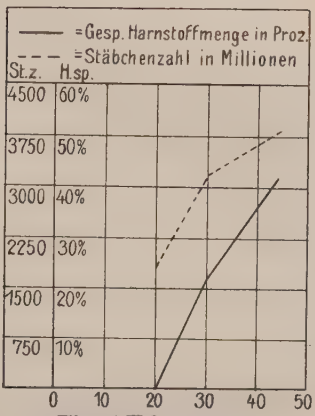


Fig. 4. Stamm B.
II. Zählversuchsreihe.

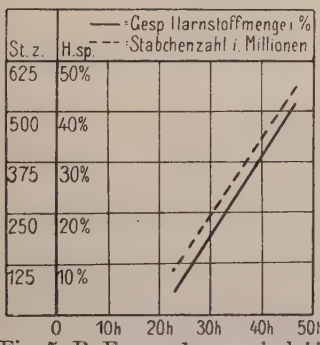


Fig. 5. B. Freudenreichii.
I. Zählversuchsreihe.

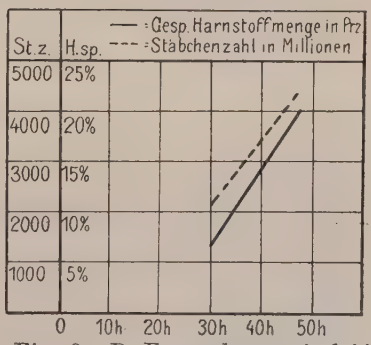


Fig. 6. B. Freudenreichii.
II. Zählversuchsreihe.

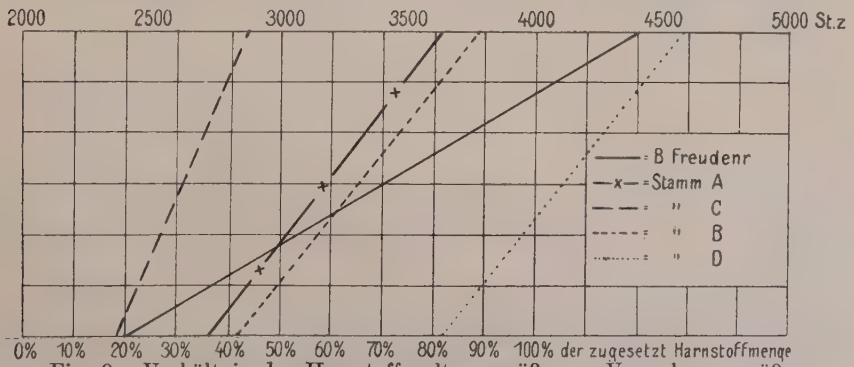


Fig. 9. Verhältnis der Harnstoffspaltungsgröße zur Vermehrungsgröße.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 160 Quadrate kamen 474 Stäbchen
„ 2: „ 100 „ „ 252 „
Resultat: „ 260 „ „ 726 „
„ 1 „ „ 2,8 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 2,8.4 = 11,2 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 14.11,2 = 156,8 Mill. Stäbchen
„ 27 ccm „ „ A „ 4234 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:
Nach 44 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 4234 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,405 Proz. Harnstoff = 20,25 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

Tabelle XV.

Versuchsmaterial	Sporen-impfmenge in Mill.	Versuchs-dauer in Std.	Gespalten von 2% Harnstoff %	Stäbchen-zahl in Mill.	Art der Zählung
I. Versuchsreihe. B. Freudenr. 21 Kg. auf Ammon-Agar	5,8	23	4,5	116	einzellige u. fäd. Oidien
B. Freudenr. 21 Kg. auf Ammon-Agar	5,8	46¾	42	556	„
I. Versuchsreihe. St. B. 21Kg.auf Ammon-Agar	10	23	7,5	255	„
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	46	88,5	1426	„
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	46½	81	1375	„
II. Versuchsreihe. B. Freudenr. 21 Kg. auf Ammon-Agar	10	30	6,75	2133	ein-lange Oidien
B. Freudenr. 21 Kg. auf Ammon-Agar	10	44	20,25	4234	„
St. A. 21Kg.auf Ammon-Agar	10	20	—	2037	„
St. A. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	30	36	3618	„
II. Versuchsreihe. St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	20	—	1834	„
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	30	21	3165	„
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	44	42	3782	„
St. C. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	22	—	864	„
St. C. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	47	18,75	2877	„
St. D. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	21	81,75	4586	„

Gesamtresultat:

Nach 30 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen über 2100 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,135 Proz. Harnstoff = 6,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, nach 44 Stunden waren gebildet rund 42 Millionen Stäbchen, gespalten 0,4 Proz. Harnstoff = 20 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge. (Fig. 6 p. 129.)

Resultat der vergleichenden Untersuchung der Harnstoffspaltung.

Wie ich schon bei der Methode der Bakterienzählung und bei den einzelnen Versuchen erwähnte, ging ich bei den vergleichenden Untersuchungen der Harnstoffspaltung bei den verschiedenen Stämmen von jeweils 10 Millionen Sporen der verschiedenen Stämme aus, die unter möglichst gleichen Bedingungen herangezüchtet worden waren.

Das Sporenmaterial wurde in 20 ccm sterile Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff eingeimpft, die Kulturen bei 28° C hingestellt und nach bestimmten Zeiten (innerhalb 20—50 Stunden) die Vermehrungs- und Spaltungsgröße bestimmt. Der Zählung der Oidien wurde möglichst die durchschnittliche Sporangiengröße zugrunde gelegt. Dabei stellte sich heraus, daß die Größe der Harnstoffspaltung annähernd der gefundenen Oidienzahl proportional ist; dieses gilt für die Stämme A—D. Aus den Tabellen geht das nahe Verhältnis der Harnstoffspaltungsgröße zur Vermehrungsgröße deutlich hervor (siehe auch Fig. 8 p. 128, Fig. 9 p. 129).

Stäbchenzahl in Millionen	Gespaltene Harnstoffmenge in g
2076	0,0
2877	0,075
3165	0,084
3618	0,144
3782	0,168
4586	0,327

Die Vermehrungs- und Spaltungsgröße in 20 ccm 2-proz. Harnstoffbouillon ist also folgende:

Bei	rund	2100	Millionen	Stäbchen	sind	gespalten	rund	0	Proz.
„	„	2900	„	„	„	„	„	19	„
„	„	3200	„	„	„	„	„	21	„
„	„	3600	„	„	„	„	„	36	„
„	„	3800	„	„	„	„	„	42	„
„	„	4600	„	„	„	„	„	82	„

des zugesetzten Harnstoffs.

Daraus geht hervor, daß die Harnstoffspaltung erst nachweisbar wird, wenn mehr als 2000 Millionen Stäbchen in 20 ccm Bouillon gebildet sind. Nehmen wir an, daß bei 2500 Millionen Stäbchen eben Ammoniak nachzuweisen ist, so finden wir für weitere je 500 Millionen Stäbchen etwa 20 Proz. des zugesetzten Harnstoffs zersetzt: bei 3000 = 20 Proz., bei 3500 = 40 Proz., bei 4500 = 80 Proz. des zugesetzten Harnstoffs.

Ein abweichendes Resultat ergaben die Versuche mit Bac. Freudenreichii, Stamm I Löhnis.

Hier entsprachen

Stäbchenzahl in Millionen	Gespaltene Harnstoffmenge in g
2133	0,027
4234	0,081

Die Vermehrungs- und Spaltungsgröße in 20 ccm 2-proz. Harnstoffbouillon beträgt also:

Bei rund 2100 Millionen Stäbchen sind gespalten rund 7 Proz., bei rund 4400 Millionen rund 20 Proz. des zugesetzten Harnstoffs.

Berücksichtigt man nun aber die durchschnittlichen Größen der Zellen der verschiedenen Stämme und berechnet daraus ihre Oberfläche, so erhält man Resultate, die auf eine Abhängigkeit der Harnstoffspaltungsgröße von der Oberflächengröße der spaltenden Zellen schließen lassen:

Die durchschnittliche Größe der Zellen von Bac. Freudenreichii, St. I, Löhnis beträgt 2 μ in der Länge, 0,6 μ in der Breite, von Bac. probatus, St. B. (Urob. Leubei) beträgt 3 μ in der Länge, 0,8 μ in der Breite.

Nach der Oberflächenformel $2\pi r^2 + 2r\pi . H$ berechnet sich die Oberfläche von Bac. Freudenreichii mit 4,336 μ^2, die Oberfläche von Bac. probatus, St. B. mit 8,545 μ^2.

Wir vergleichen nun die Abhängigkeit der Harnstoffspaltungsgröße von der Zellzahl und Zelloberfläche bei Bac. Freudenreichii mit der bei Bac. probatus, St. B. beobachteten oder wir vergleichen nur die Zahlen, so finden wir (siehe die Tabelle) z. B. nach 44 Stunden, daß rund 4400 Millionen Stäbchen von Bac. Freudenreichii mit einer Oberfläche von über 4 μ^2 pro Zelle rund 20 Proz. des zugesetzten Harnstoffs gespalten haben, während rund 3800 Millionen Stäbchen von Bac. probatus, St. B. mit einer Oberfläche von über 8 μ^2 42 Proz. des zugesetzten Harnstoffs gespalten haben. Wir sehen, daß bei nicht zu großem Zahlenunterschied, aber doppelt großer Oberfläche der Zellen in dem einen Falle hier auch die doppelte Menge Harnstoff gespalten wird. Zum Nachweis der hier vermutungsweise ausgesprochenen Gesetzmäßigkeit müßten allerdings exaktere Versuche möglichst mit genauem Messen der Zellängen vorgenommen werden.

Berechnung der Stundengärleistung von Bac. Freudenreichii, St. I, Löhnis und Bac. probatus, St. B. (Urobac. Leubei).

Die Berechnung der Stundengärleistung, d. h. der Menge eines Stoffwechselproduktes oder Spaltungsproduktes, das innerhalb 1 Stunde von einer durchschnittlichen Einzelzelle produziert oder abgespalten wird, wurde nach der Rahnschen Formel (Ableitung, siehe O. Rahn 1912) ausgeführt.

In der Formel: $x = \frac{H . \log. \frac{b}{a}}{t\,(b-a)\log. 2}$ ist

x = Stundengärleistung,
H = die Menge des gespaltenen Harnstoffs,
a = die Zellenzahl am Anfang des Versuches,
b = die Zellenzahl nach der Zeit t,
t = die Versuchsdauer.

1. Bacillus Freudenreichii, Stamm I, Löhnis.

Aus 10 Millionen in 2-proz. Harnstoffbouillon eingeimpften Sporen waren nach 30 Stunden gebildet: 2133 Millionen Stäbchen, gespalten: 0,027 g Harnstoff; nach weiteren 14 Stunden, also insgesamt 44 Stunden Versuchsdauer: 4390 Millionen Stäbchen, gespalten: 0,081 g Harnstoff.

Demnach war die gespaltene Harnstoffmenge H = 0,054 g Harnstoff, a = 2133 Millionen Stäbchen, b = 4390 Millionen Stäbchen, t = 14 Stunden und $x = 1{,}78 . 10^{-12}$ g Harnstoff.

2. Bacillus probatus, Stamm B. (Urobac. Leubei).

Aus 10 Millionen in 2-proz. Harnstoffbouillon eingeimpften Sporen waren nach 30 Stunden gebildet: 3165 Millionen Stäbchen, gespalten: 0,084 g Harnstoff; nach weiteren 14 Stunden, also insgesamt 44 Stunden Versuchsdauer, waren gebildet: 3782 Millionen und 0,168 g Harnstoff gespalten.

Demnach war $H = 0{,}084$ g Harnstoff, $a = 3165$ Millionen Stäbchen, $b = 3782$ Millionen Stäbchen, $t = 14$ Stunden und $x = 2{,}5 \cdot 10^{-12}$g Harnstoff.

Berechnungen aus der Menge des Sporenimpfmaterials und der nach bestimmten Zeiten daraus enstandenen Stäbchenzahl ohne oder mit Berücksichtigung der mittleren Keimungszeit von 15 Stunden, gibt anscheinend keine genauen Resultate, weshalb ich von der Ausführung dieser Berechnungsversuche absehe.

Will man also die Stundengärleistung ermitteln, so ist es bei Sporenimpfung nicht so wichtig, die Anzahl der eingeimpften Sporen zu kennen, als vielmehr in mindestens zwei Zeitabständen die Stäbchenzahl und in unserem Falle gleichzeitig auch die Menge des gespaltenen Harnstoffes zu ermitteln; dabei ist zu berücksichtigen, daß die Zeitabstände so gewählt werden müssen, daß in dem ersten Falle möglichst alle Sporen gekeimt sind und schon Harnstoff gespalten ist, in dem zweiten Falle noch ein Wachstum stattfinden kann und noch unzersetzter Harnstoff vorhanden ist. In unseren Versuchen wählten wir (siehe oben) die Zeitabstände 30 und 44 Stunden, bei denen meist die erwähnten Voraussetzungen erfüllt waren.

Kapitel 11.

Kritische Literaturübersicht über harnstoffspaltende Bakterien.

In der Literatur sind eine große Zahl von Bakterienspezies aufgeführt, denen das Vermögen der Harnstoffspaltung zukommen soll. Die Angaben sind jedoch so unvollkommene, die Beschreibungen nach dem jetzigen Stand unserer Kenntnisse so unzureichende, daß es tunlich schien, in ähnlicher Weise wie Bredemann (1909) vorzugehen, d. h. die Beschreibungen kritisch auf ihren Wert als Speziesdiagnose zu prüfen und die als harnstoffspaltend beschriebenen Formen unter Berücksichtigung der bei unserer Spezies beobachteten Variationsbreite der Eigenschaften zu gruppieren in

I. bestimmt zu unserer Spezies Bac. probatus gehörende Formen (hierhin jene, die ich selbst in Kultur hatte und die sich beim Vergleich als Bac. probatus A. M. et Viehoever erwiesen);

II. wahrscheinlich zu unserer Spezies Bac. probatus zu rechnende Formen (hierhin Formen mit wenigstens einer Anzahl von diagnostischen, für die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechenden Merkmalen und ohne ein wesentlich davon abweichendes Merkmal);

III. möglicherweise zu unserer Spezies Bac. probatus gehörende Formen (hierin solche, die Merkmale aufweisen, welche für und welche gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechen);

IV. wahrscheinlich nicht zu unserer Spezies gehörende Formen (solche, die Merkmale aufweisen, welche für und gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechen, die aber wegen mangelhafter Charakterisierung zu streichen sind);

V. sicher nicht zu unserer Spezies gehörende Formen (solche, die zwar

das Harnstoffspaltungsvermögen mit unserer Spezies gemeinsam haben, sonst aber abweichende Merkmale aufweisen).

I. Nach meinen Untersuchungen bestimmt zur Spezies Bac. probatus zu rechnende Formen:

1. Urobacillus pasteurii (Miquel) Beijerinck.
2. „ leubei Beijerinck.
3. Bacillus Pasteurii (Miquel) Migula, Stamm B_3 Löhnis.

II. Wahrscheinlich zu unserer Spezies Bac. probatus gehörende Formen (hierhin also Formen mit wenigstens einer Anzahl von diagnostischen, für die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechenden Merkmalen und ohne ein wesentlich davon abweichendes Merkmal); die Spezies sind wegen nicht genügender Beschreibung, zu weitgehender Berücksichtigung der Harnstoffspaltung und wegen des Ausgestorbenseins der Originalkulturen zu streichen.

1. Bacillus ureae α = Urobacillus Madoxii Miquel,
2. „ „ γ = „ Freudenreichii Miquel,
3. „ „ β = „ Duclauxii Miquel,
4. „ „ ϱ = „ Pasteurii Miquel,
5. „ „ δ = „ Miquel,
6. „ „ ε = „ Miquel,
7. „ „ Stamm II Burri,
8. „ „ „ III Burri,
9. Bacterium ureae = Bacillus ureae (Leube) Günther.
10. Die sporenbildenden harnstoffspaltenden Bakterien von Rochaix et Dufourt.

Die Miquelschen Spezies (1—6).

Miquel berücksichtigte bei der Beschreibung seiner Spezies in erster Linie zu ihrer Unterscheidung die Menge Harnstoff, die von den betreffenden Bakterien in einer gewissen Zeit gespalten wurde. Er stellte sogar nach seinen Resultaten folgende Bestimmungstabelle für die Harnstoffbakterien auf, er unterschied (siehe auch Koch 1893. p. 287):

a) Arten, die mehr als 0,1 Proz. Harnstoff pro Stunde zersetzen:
Urobacillus Pasteurii (Miquel) zersetzt 0,3 Proz. Harnstoff pro Stunde,
„ Duclauxii (Miquel) zersetzt 0,15 Proz. Harnstoff pro Stunde.

b) Arten, die weniger als 0,1 Proz. Harnstoff pro Stunde zersetzen, aber wenigstens 0,5 Proz. Harnstoff pro Tag:
Urobacillus Madoxii zersetzt 0,8 Proz. Harnstoff pro Tag,
„ Freudenreichii zersetzt 0,6 Proz. Harnstoff pro Tag,
„ δ zersetzt 0,5 Proz. Harnstoff pro Tag.

c) Arten, die weniger als 0,5 Proz. Harnstoff zersetzen, langsam und unvollständig arbeiten:
Urobacillus ε zersetzt 0,05 Proz. Harnstoff pro Tag.

So hat Miquel wesentlich auf Grund ihres verschiedenen Harnstoffspaltungsvermögens gegen 60 Arten sporenbildende und nichtsporenbildende, stäbchen- und kokkenförmige harnstoffspaltende Bakterien angenommen, aber in seinem Buche (1898) nur einen Teil näher beschrieben. Das Ver-

mögen der Harnstoffspaltung hielt er für eine ganz konstante, den Harnstoffbakterien eigentümliche Eigenschaft, die nur bei den verschiedenen Arten variiere. Er sagt (1898. p. 21): „la faculté de transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque est d'une puissance variable, suivant les espéces considerées mais elle parait constante dans les conditions identiques d'expérimentation pour les microbes bien isolés et cultivés à l'état de pureté; c'est le caractère qui à mon sens, doit être mis au prémier rang . . . . ."

Miquel weist hier auf die Notwendigkeit gleicher Kulturbedingungen beim Studium der Harnstoffspaltung der verschiedenen Arten hin.

Nach meinen Erfahrungen (siehe p. 98) kommen nun außer der Konstanz der Kulturverhältnisse, deren Innehaltung aus den Miquelschen Versuchen nicht immer klar zu ersehen sind, auch die Impfverhältnisse für die Größe der Harnstoffspaltung in Betracht. Als wichtigstes Resultat stellte sich aber bei meinen Versuchen heraus, daß die Größe der Harnstoffspaltung im wesentlichen abhängig ist von der Größe der Vermehrung.

Aus den Miquelschen Versuchen entnehme ich, daß er nicht von einheitlichem Impfmaterial ausgegangen ist; meist fehlen nähere Angaben über den Entwicklungszustand der eingeimpften Bakterien, zuweilen impfte er mit vergorener Harnstoffbouillon und zwar mit einigen Tropfen. Die Menge des Impfmaterials stellte er anscheinend in keinem Falle fest; in zwei Fällen ermittelte er das Gewicht der Bakterienmasse; die Vermehrungsgröße, d. h. die nach einer bestimmten Zeit gebildete Stäbchenzahl wurde nicht ermittelt.

Das Resultat der Spaltungsgröße ermittelte er in der Weise, daß er von Beginn der Spaltung an, den weiteren Verlauf der Harnstoffspaltung pro Stunde oder Tag verfolgte und das Resultat als die spezifische Spaltungskraft der betreffenden Bakterien ansah.

Da nun aber ein durch irgendwelche Umstände geschwächter oder andererseits an Harnstoff besonders angepaßter Stamm eine andere Vermehrungsgröße und demzufolge auch eine andere Spaltungsgröße aufweisen muß, so ist daraus zu ersehen, daß die Feststellung der Spaltungsgröße allein kein differentialdiagnostisches Merkmal sein kann; sie wird erst brauchbar zur Speziesdiagnose, wenn bei Innehaltung einer bestimmten Vorbehandlung gleichzeitig die Vermehrungsgröße zahlenmäßig ermittelt wird und damit das Verhältnis der Stäbchenzahl zur Harnstoffspaltungsgröße festgelegt wird.

Miquel hat nun aber, wie schon gesagt, nur die Spaltungsgröße bestimmt, nicht die Vermehrungsgröße; wir müssen deshalb seine diesbezüglichen Angaben als speziesdiagnostisch nicht verwertbare Merkmale bezeichnen, die darauf gegründeten Spezies als nicht mehr wieder zu erkennende ganz fallen lassen.

Morphologische Merkmale.

Bezüglich der Größe und Form seiner sporenbildenden Arten betont Miquel die große Ähnlichkeit aller bis vielleicht auf „Urobacillus Duclauxii"; er sagt von ihm (1898. p. 77): „C'est le seul ferment de l'urégé dont il me semble possible d'affirmer l'individualité au moyen de l'examen microscopique direct."

Die wenigen Angaben über Größe und Form der Sporen und Stäbchen sprechen, zumal bei Berücksichtigung der Variation, für die Zugehörigkeit der sporenbildenden Miquelschen Spezies, auch des „Urobacillus Duclauxii" zu unserer Spezies Bac. probatus. Für „Urobacillus Madoxii" betont Miquel das charakteristische Vorkommen von

hefeähnlichen Involutionsformen; Involutionsformen ähnlicher Gestalt habe ich in allen Kulturen zuweilen beobachten können, besonders aber in den harnstoffhaltigen; auch Péja et Raja (1906, p. 60) haben auf Zusatz von Harnstoff zu Nährböden ganz abweichende Formen bei den verschiedensten Bakterien erhalten können, eine Beobachtung, auf die ich hier hinweisen möchte.

Beweglichkeit: Die Stäbchen von „Urobacillus δ und ε zeigten keine Bewegung, aber Neigung zur Fadenbildung, waren also zweifellos geschwächt; das Fehlen der Bewegung ist ja kein speziestrennendes Merkmal (siehe auch Ellis), zumal hier bei harnstoffspaltenden Bakterien, wo durch die Kultur in stark alkalischen Nährböden das Bewegungsvermögen überhaupt sehr geschwächt oder ganz aufgehoben werden kann.

Kulturelle Merkmale:

Das Wachstum auf schwach harnstoffhaltigen Nährböden war verhältnismäßig gut, auf harnstoffreien Nährböden fast durchweg sehr schlecht; da, wo besseres Wachstum beobachtet wurde, wie z. B. bei Urob. δ, ε und Freudenreichii fehlen, genauere Angaben über die Alkalität der benutzten Nährböden. Im Hinblick hierauf, sowie in Berücksichtigung der Tatsache, daß Angaben über die Vorkultur seiner Spezies überhaupt fehlen, sprechen Miquels Beobachtungen nicht gegen unsere Annahme der Zugehörigkeit seiner Spezies zu unserer.

Kardinalpunkte der Temperatur und Sauerstoffspannung.

Maximum der Temperatur für Wachstum.

Miquel gibt an, daß von seinen Spezies nur Urob. Madoxii, Duclauxii und Pasteurii bei 40° zu kultivieren seien, nicht aber Urob. δ, ε und Freudenreichii (Miquel). Da aber nähere Angaben über Kultur und Vorkultur, wie vor allem die über das tatsächliche Maximum der Temperatur für das Wachstum seiner letzten drei Formen fehlen, so ist auch das Ausbleiben ihres Wachstums bei 40° nicht als speziestrennendes Merkmal anzusehen.

Minimum der Sauerstoffspannung für das Wachstum.

Die Bakterien konnten in sauerstoffreiem Raume nicht wachsen, kamen aber mit wenig Sauerstoff aus, eine Beobachtung, die ja auch für meine Spezies zutrifft.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen hohe Temperatur (feuchte Wärme).

Nach Miquel (1904. p. 87—90) können Sporen von

Urob.	Pasteurii (Miquel)	eine	Wärme	von	87—90°	2	Stunden aushalten
„	Duclauxii	„	„	„	95°	2	„ „
„	Freudenreichii	„	„	„	94°	2	„ „
„	Madoxii	„	„	„	94°	2	„ „
„	ureae δ	„	„	„	90°	2	„ „
„	„ ε	„	„	„	90°	2	„ „

Wenn auch die Resultate gut untereinander übereinstimmen, so ist doch die Tötungszeit der Sporen aus ihnen nicht zu ersehen, die Angaben haben also nur einen bedingten Wert für die Speziesdiagnose; sie sprechen aber weder für eine Verschiedenheit der Spezies untereinander, noch von meiner Spezies.

Giftkonzentration für Wachstum und Gärung.

Miquel ermittelte zur weiteren Kennzeichnung seiner Spezies auch die Giftkonzentration

1. für Wachstum, indem er dem Nährboden eine bestimmte Menge Silbernitrat, Sublimat, Kupfersulfat, Karbolsäure oder Borsäure zusetzte und dann ermittelte, bei welcher Konzentration kein Wachstum mehr stattfand;

2. für Gärung, indem er der geimpften Kulturbouillon Giftlösungen zusetzte und die Konzentration feststellte, bei der eine Gärung vollständig unterdrückt wurde.

Die etwas voneinander abweichenden Resultate sind jedoch für die Speziesdiagnose nicht zu gebrauchen, da, so weit ich aus seinen Angaben (1904. p. 79) schließen kann, die Kulturbedingungen und Impfmengen keine gleichen in den verschiedenen Versuchen waren, vor allem aber weil die Entwicklungsstadien nicht einheitlich und nicht gleich gewesen zu sein scheinen: Sporen enthaltende Nährflüssigkeiten erfordern natürlich zur Hemmung oder Abtötung eine weit größere Konzentration der Giftlösung als sporenfreie, oidienhaltige Nährmedien; auf diese Tatsache ist, wie ich vermute, auch die Verschiedenheit in den Resultaten der Miquelschen Versuche zurückzuführen.

Gelatineverflüssigungsvermögen.

Auf Harnstoffgelatine beobachtete Miquel gewöhnlich keine Verflüssigung; das Schleimigwerden der Gelatine nach 40—50-tägiger Kultur z. B. von Urob. Duclauxii führt er auf den Einfluß des freigemachten Ammoniaks und nicht auf die unmittelbare Tätigkeit der Bakterien zurück. Bei Kultur von Urob. Freudenreichii (Miquel) auf Fleischgelatine zeigte diese nach 10 Tagen einen Verflüssigungstrichter und war nach 4 Wochen gänzlich verflüssigt. Das Gelatineverflüssigungsvermögen kann bekanntermaßen allein als speziesdiagnostisches, trennendes Merkmal nicht herangezogen werden, da das Eintreten oder Ausbleiben der Gelatineverflüssigung von sehr vielen, meist nicht berücksichtigten, zum Teil wohl auch noch nicht bekannten Faktoren abhängig ist. Es liegt also auch hier kein Grund vor, die verflüssigende Miquelsche Spezies abzutrennen als besondere Spezies, zumal da ja meine Spezies nach längerer Kultur ebenfalls Verflüssigung zeigte.

Da wir nun bei unserem kritischen Vergleich kein wesentliches Merkmal haben feststellen können, das gegen die Zugehörigkeit der genannten Miquelschen Spezies zu unserer Spezies sprechen könnte, andererseits aber viele gemeinsame Merkmale fanden, so halten wir es für sehr wahrscheinlich, daß die genannten Spezies identisch sind mit unserer Spezies Bacillus probatus A. M. et V. Der endgültige Beweis konnte jedoch nicht geliefert werden, da die Miquelschen Spezies alle eingegangen sind und Kulturen zum Vergleich nicht mehr zu erhalten waren; wir müssen deshalb die Miquelschen Spezies als nicht mehr sicher wieder zu erkennende und auf unsichere Merkmale gegründete, ganz aus der Bakteriensystematik ausscheiden.

Bacillus ureae, Stamm II und III Burri, Herf., Stutz., (7—8).

Burri, Herfeldt und Stutzer (1894) sahen ebenfalls wie Miquel in der Feststellung der Harnstoffspaltungsgröße ein unerläßliches Merkmal zur Charakterisierung eines Harnstoffspalters. Die von ihnen isolierten sporenbildenden Formen spalteten, in 2 Proz. Harnstoffbouillon kultiviert, den ganzen Harnstoff in 12 Stunden, der Verlauf der Spaltung

war in beiden Fällen ein ähnlicher. Über den Wert dieser Feststellung für die Speziesdiagnose vergleiche das bei Besprechung der Miquelschen Spezies Gesagte.

Form und Lage der Spore, Größe der Oidien, Wachstum auf harnstoffreien und harnstoffhaltigen Nährböden, Bildung von Trimethylamin und Ausscheidung von Kristallen in harnstoffhaltigen Nährmedien entsprechen bei beiden Stämmen den für unsere Spezies festgelegten Beobachtungen. Daß bei Stamm II keine Bewegung der Stäbchen, bei Stamm III keine trommelschlägerförmig angeschwollenen Sporangien beobachtet wurden, daß nur bei der Kultur von Stamm III auf 2-proz. Harnstoffgelatine Verflüssigung stattfand, alles das spricht bei Berücksichtigung des oben Gesagten, sowie der Variation dieser Eigenschaften nicht gegen unsere Annahme, daß beide Stämme identisch sind mit unserer Spezies Bac. probatus. Da auch diese Stämme ausgestorben sind, so müssen sie als nicht mehr sicher wieder zu erkennende Arten ebenfalls fallen gelassen werden.

Bacterium ureae Leube = Bacillus ureae (Leube) Günther (9).

Leube und Graser (1885) isolierten aus gärendem Harn einen stäbchenförmigen Bazillus mit stark harnstoffspaltender Wirkung.

Tabelle von

No.	Form	Sporen	Beweglichkeit	Gramfärbung	Gelose	Gelatine	Serum coaguli	Kartoffel
1	Bacillus	+	+	—	dick weißlich	Verflüssigt	Verflüssigt	Kultur braun mit gefalteter Oberfläche
2	Bacillus	+	+	—	dick	Verflüssigt	Verflüssigt	mit Mühe sichtbar
3	Micrococcus	—	—	—	schnell gewachsen reichlich	Nicht verflüssigt	Nicht verflüssigt	Kultur reichlich dick
4	Micrococcus	—	—	—	Kultur dick weißlich	Nicht verflüssigt	Nicht verflüssigt	Kultur dick weiß
5	Bacillus	—	+	—	goldgelb	Verflüssigt	Nicht verflüssigt Kultur gelb	Kultur dick gelb
6	Bacillus	+	+	—	Kultur etwas dick	Nicht verflüssigt	Nicht verflüssigt	Kultur kaum sichtbar
7	Bacillus	—	+	—	Kultur dick weißlich	Verflüssigt	Verflüssigt	Kultur kaum sichtbar
8	Bacillus	+	+	—	Kultur weiß dick	Verflüssigt	Verflüssigt	Kultur dick bräunlich

Das Vermögen der Harnstoffspaltung, die Größe der Stäbchen, das schlechte Wachstum auf gewöhnlichen, harnstoffreien Nährböden, die Bildung von heringslakeähnlichem Geruch (Trimethylamin ?) sprechen für die Zugehörigkeit zu unserer Spezies, nicht dagegen spricht das Ausbleiben der Gelatineverflüssigung. Eine Angabe über das Vorkommen von Sporen fehlt, jedoch scheint Leube Sporangien gesehen zu haben. da er auf das Vorkommen von 3,5 μ langen Stäbchen mit deutlicher Einschnürung in der Mitte und Abrundung des anliegenden Endes hinweist.

Die sichere Entscheidung der Zugehörigkeit dieses Bacillus zu unserer Spezies ist jedoch wegen der unzureichenden Beschreibung und des Einganges der Kultur nicht möglich, weshalb wir auch diese Spezies fallen lassen.

Sporenbildende harnstoffspaltende Bakterien von Rochaix et Dufourt (10).

Rochaix und Dufourt haben aus Pferdemist sporenbildende und nichtsporenbildende Bakterien mit Harnstoffspaltungsvermögen isoliert. Sie stellten, wie aus der beigegebenen Tabelle ersichtlich ist, nur einige kulturelle und biochemische Eigenschaften fest. Eine Entscheidung über die Zugehörigkeit der sporenbildenden Formen zu unserer Spezies läßt sich wegen der ganz ungenügenden Beschreibung nicht fällen, zumal da die Kul-

Rochaix und Dufourt.

Bouillon	Milch	Tournesol	Neutralrot	Indol	Vergärung von		
					a) Laktose	b) Glykose	c) Harnstoff
trübe mit leichtem Schleier	Koaguliert	Keine Veränderung	Übergang ins Gelbe mit grünl. Fluoreszenz	—	—	—	+
trübe und schleimig auf der Oberfläche	Koaguliert	Übergang ins Rote	Übergang und Fluoreszenz	+	+	+	+
Gleichmäßige Trübung ohne Schleier	Nicht koaguliert	Stich ins Rote	Übergang und Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung gleichmäßig ohne Schleier	Nicht koaguliert	Keine Veränderung	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung gleichmäßig	Nicht koaguliert	Keine Veränderung	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung gleichmäßig	Nicht koaguliert	Keine Veränderung	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung gleichmäßig	Koaguliert	Keine Veränderung	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung und Schleier an der Oberfläche	Alkalibildung	Stich ins Blaue	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+

turen, trotz meiner Bemühungen, nicht zu erhalten waren. Deshalb müssen auch diese Formen fernerhin unberücksichtigt bleiben.

III. Möglicherweise zu unserer Spezies gehörende Formen (hierhin solche, die Merkmale aufweisen, die für und die gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechen; diese könnten bei weiteren Untersuchungen sehr vieler Stämme noch in die Variationsgrenzen der Spezies fallen).

1. Bacillus Freudenreichii (Miquel) Migula, Originalstamm Löhnis.

2. Bacillus Pasteurii (Miquel), Stamm A_{4a}, Migula, Originalstamm Löhnis.

Bacillus Freudenreichii (1), (Originalstamm Löhnis), Stamm I.

Wie aus den Resultaten unserer vergleichenden Versuche zu ersehen ist, stimmen viele Eigenschaften im wesentlichen mit den bei unserer Spezies beobachteten überein. Dagegen stimmt nicht die Größe der Sporen und Stäbchen, die wesentlich kleiner sind, ferner ist das Verhältnis der Stäbchenzahl zur Harnstoffspaltung, d. h. die Spaltungsgröße eines Oidiums eine andere als die bei unserer Spezies beobachtete. Wir müssen deshalb diese Spezies noch als eine besondere Spezies betrachten, vorbehaltlich einer Änderung dieser Annahme nach genauerer Untersuchung einer größeren Anzahl von Stämmen des Bac. probatus oder Freudenreichii.

Bacillus Pasteuri (2), (Stamm A_{4a}), Originalstamm (Löhnis).

Der Stamm verhielt sich ähnlich wie der Stamm I des Bac. Freudenreichii Löhnis, war jedoch so geschwächt und bildete so wenig Sporen, daß es nicht möglich war, die Variation der Sporengröße und von Sporen ausgehend die Vermehrungs- und Spaltungsgröße festzustellen. Wir müssen deshalb unentschieden lassen, ob der Stamm zu unserer Spezies oder zu Bac. Freudenreichii zu rechnen ist oder von beiden verschieden ist.

IV. Wahrscheinlich nicht zu unserer Spezies zu rechnende Formen (also solche, die Merkmale aufweisen, welche für und solche, welche gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechen; Spezies, die wegen mangelhafter Charakterisierung ganz zu streichen sind).

1. Bacterium vernicosum (Zopf).

Der Bacillus wurde von Zopf (1892) aus Baumwollsaatmehlen, die angeblich schädlich waren für Tiere, isoliert.

Das Harnstoffspaltungsvermögen und das Wachstumsmaximum bei 45 bis 46° C sprechen für, das kulturelle Verhalten und die Bildung von Gas (CO_2) gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies. Wegen der mangelhaften Beschreibung ist die Spezies ganz zu streichen.

V. Sicher nicht zu unserer Spezies gehörende Formen (hierhin stelle ich also alle die Formen, die zwar das Harnstoffspaltungsvermögen mit unserer Spezies gemein haben sollen, die aber sonst abweichende Merkmale aufweisen).

A. Stäbchenförmige Bakterien.

1. Mit Sporen:

Bacillus mycoides (siehe Löhnis 1905. p. 397. 1910. p. 460).

Bacillus megatherium (siehe Löhnis 1905. p. 397. 1910. p. 460).

Bacillus pumilus A. M. et Gottheil (Bierema 1909. p. 708. Löhnis 1910. p. 460).

2. Ohne Sporen:

Bacillus erythrogenes (Söhngen 1909, Löhnis 1905).

Bacillus Kirchneri, Löhnis (1905).

„ lipsiense Löhnis (1905).

„ putidum Löhnis (1905).

„ fluorescens liquefaciens (Warington 1888).

„ praepollens (Maassen 1899).

Urobacillus Jakschii (Söhngen 1909).

„ Miquelii (Beijerinck 1901), nach Beijerinck mit Bact. Zopfii und Bact. asteriodes phylogenetisch zu einer Gruppe gehörend.

Urobacillus Beijerinckii (Christensen 1910).

Bacterium vulgare = Bacillus vulgaris Macé, Migula = Bac. Proteus vulgaris Hauser = Proteus Hauseri = B. Proteus vulgaris Kruse = B. albus cadaveris Strecker und Straßmann = Bac. foetidus ozenae Hajek = Urobacillus liquefaciens septicus Krogius (Lehmann und Neumann 1907. p. 385).

Bacterium coli (Escherich, Lehmann und Neumann 1912).

Bacterium prodigiosum (Ehrenberg, Lehmann und Neumann 1912).

Bacterium Kiliense (Fischer et Breunig) Lehmann et Neumann 1912; mit Bacterium prodigiosum identisch oder nächstverwandte Art, nach Lehm. et Neum.

Bacterium indicum, mit Bact. prodigiosum nächstverwandt (Löhnis 1910, Lehm. et Neum. 1912).

B. Kokkenförmige Bakterien.

a) Sarzinen.

1. Mit Sporen:

Planosarcina ureae (Beijerinck) 1901.

Urosarcina dimorpha (Beijerinck) 1901; konnte weder von Beijerinck selbst, noch von Král erhalten werden.

2. Ohne Sporen:

Sarcina ventriculi (Leube 1885).

b) Kokken ohne Sporen.

Micrococcus ureae = Urococcus van Tieghemi = Torul. ammoniacale Pasteurii (Beij. 1901, Miquel 1904).

Micrococcus ureae liquefaciens Flügge = Micrococcus u. Staphylococcus pyogenes j. albus Rosenbach = Micrococcus pyogenes Migula = (?) Micrococcus candicans Flügge (Lehmann et Neumann 1907) = Staphylococcus ureae liquefaciens Burchard.

Micrococcus pyogenes *α* aureus (Lehmann et Neumann 1912).

Staphylococcus pyogenes aureus (Moll 1902. 2. p. 347).

Ganz unsicher ist die systematische Stellung des Urobacillus Schützenbergii I und II (Miquel 1904), des Urococcus

Dowdeswelli und der Urosarcina Hansenii (ebenda), sowie der zahlreichen Miquelschen Urococcus-Spezies, ferner die des Bac. ureae I Burri, Herfeldt und Stutzer, des Bact. ureae Leube, St. 4, der von Christensen isolierten Stämme a—e, wie schließlich die systematische Stellung der von Rochaix et Dufourt isolierten, nichtsporenbildenden, harnstoffspaltenden Bakterien (Tabelle p. 139).

Nach Löhnis (1910. p. 458—459) gehören in die Proteus-Gruppe sicher der Urobacillus Miquelii Beijerinck, vermutlich auch der Urobacillus Schützenbergii I Miquel, II Cambier, der Urobacillus Jakschii Söhngen und vielleicht auch das Bacterium ureae Leube; der Bac. ureae I Burri, Herf. u. St. besitzt nach Löhnis die Eigenschaften des Bact. vulgare var. Zopfii; der größte Teil der Urococcus-Spezies gehört nach Löhnis sehr wahrscheinlich zu Micrococcus pyogenes Rosenbach.

Kapitel 12.

Zusammenstellung der wichtigsten Merkmale der Spezies Bacillus probatus A. M. et Viehoever.

Morphologische Merkmale.

Nach Vorbehandlung und Weiterzucht auf:
1. ⅓ D-Agar + 0,2% Ammonkarbonat (Ammon-Agar),
2. ⅓ „ + 0,2% Harnstoff Harnstoff-Agar,
3. ⅓ „ + 2,0% „ „ „

Sporen:
Sporenform: kugelig, elliptisch, eiförmig, zylindrisch.
„ vorwiegend kugelig (Fig. 1—3).
Sporengröße auf Ammon-Agar (Originalstamm): 0,5—1 μ breit,
„ „ „ „ 0,6—1,2 μ lang,
„ „ „ „ 0,8—0,9 μ, kugelig, am häufigsten.
„ „ „ (Spezies): 0,5—1 μ breit,
„ „ „ „ 0,5—1,2 μ lang (siehe Variationskurve p. 145).

Die Sporenmembran zeigt ungefärbt keine Differenzierung in Exine und Intine; Methylenblau (1 + 10) färbt die Exine etwas dunkler blau als die Intine. Die Spore tritt nach der Ausreifung meist nicht aus dem Sporangium heraus, sondern bleibt zuweilen monatelang in dem zu einem Hemangium (Sporangienhälfte) umgestalteten Sporangium (Fig. 3,34—39). Die Keimung der Sporen erfolgt meist äquatorial (Fig. 6,52), zuweilen auch polar (Fig. 8).

Keimstäbchen. Die Keimstäbchen entstehen auf Ammon-Agar oder 0,2 Proz. Harnstoff-Agar bei 28° nach 5—6 Stunden und sind sofort beweglich (Fig. 8,52); die peritrich angeordneten Geißeln sind dünn ausgebildet und bis zu 10 Stück an den Keimstäbchen beobachtet worden. Die Keimstäbchen auf Ammon-Agar sind einstäbig, meist 1-lang und 0,4—0,6 μ breit (Fig. 52).

Oidien. Schwärmoidien sind in 15—20 Stunden alter, bei 28° gezüchteter Kultur auf Ammon-Agar reichlich anzutreffen; meist kommen 1—3-stäbige (Fig. 15—17) und 1 μ lange, etwa 0,8 μ breite Oidien vor. Auf alkalischer Nährgelatine wurden häufiger 2—3 μ lange, einzellige Stäbchen beobachtet; ihre Länge betrug 5—10 μ, die Breite 0,8—1,0 μ (Fig. 18—19).

Auf Kartoffel-Kreidekulturen fand ich vorwiegend 0,9 μ breite, ein- und mehrzellige Stäbchen (Fig. 20—22).

Die Oidien sind peritrich begeißelt; es wurden zahlreiche, bis 10 μ lange Geißeln beobachtet (Fig. 23, 53, 55—56, 58—59).

Sporangien. Nach 3—4 Tagen entstehen auf Ammon-Agar, der mit Sporenmaterial geimpft war und bei 28° C gezüchtet wurde, mehr oder weniger endständige Sporen in klostridien-, trommelschläger- oder spindelförmig angeschwollenen Sporangien (Fig. 24—33); es gelang unter Umständen, peritriche Geißeln an den in der Kultur zum Teil lebhaft beweglichen Sporangien nachzuweisen (Fig. 33, 57).

Hemangien. Die sporenfreie Sporangienhälfte verschwindet allmählich und aus dem zurückbleibenden Sporangienrest entstehen dann gewöhnlich die sogenannten Hemangien, die die Spore noch lange Zeit, mehrere Jahre sogar, umhüllen können; sie tragen ebenfalls Geißeln (Fig. 38—39).

Reservestoffe waren in den normalen Stäbchen und Sporangien nicht nachzuweisen; in Stäbchen, die durch ungünstige Kulturbedingungen geschwächt waren und körnige, stärker lichtbrechende Massen zeigten, konnte unter Umständen etwas Fett nachgewiesen werden.

Gramdauer. Die Gramdauer betrug für 3 Tage altes, vor der Sporenausbildung befindliches Ammon-Agarmaterial 20 Minuten.

Säurefestigkeit. Die Säure-Alkoholfestigkeit für Sporen fiel negativ aus; der Chitinnachweis dagegen positiv für alle Morphoden, ebenso der Geißelnachweis (mit Ausnahme der Sporen).

Plasmolyse. Plasmolyse wurde bei Stäbchen und Sporangien beobachtet (Fig. 63).

Kulturelle Merkmale.

Kein Wachstum auf neutralen Nährböden, schlechtes und unsicheres Wachstum auf D-Agar. Entwicklungsgang des Originalstammes auf Ammon-Agar: Nach 5 Stunden Keimung, nach 15 Stunden schwach getrübtes Kondenswasser und reichlich Schwärmoidien, nach 72 Stunden deutlich sichtbarer, etwas erhabener, weißlich- bis gelblichgrauer, opalisierend durchscheinender Belag und Sporangien mit junger Sporenanlage, nach 96 Stunden Sporangien mit zum Teil reifer Spore. Ähnlich ist der Entwicklungsgang auf 0,2 Proz. Harnstoffagar. Strichkultur auf Ammon-Agar: Nach 20 bis 24 Stunden dünner Belag, welcher wegen der Ähnlichkeit seiner Farbe mit der des Agars nur schwer sichtbar ist. Auf Kartoffel tritt schlechtes, unsicheres, auf Möhre gar kein Wachstum ein. Auf Kartoffel oder Möhre mit Kreidezusatz tritt meist kräftige Entwicklung ein.

Bei Verwendung von lackmusneutralem ⅓ D-Agar liegt das Maximum des Zusatzes für Sporenkeimung nach Zusatz von Natriumkarbonat (wasserfrei) bei etwas über 2 Proz., von Ammonkarbonat bei etwas über 22 Proz., von Harnstoff bei etwas über 30 Proz.; das Optimum des Zusatzes für Sporenkeimung, des Wachstums und der Sporenbildung liegt nach Zusatz von wasserfreiem Natriumkarbonat bei etwa 0,2 Proz., von Ammonkarbonat bei etwa 0,3 Proz., von Harnstoff unter 3 Proz.

In flüssigen neutralen Nährböden, z. B. Bouillon und den A. Meyerschen Nährlösungen findet kein Wachstum statt. Nach Zusatz von 0,1 Proz. Natriumkarbonat tritt nur in den peptonhaltigen Nährlösungen eine deutliche Entwicklung ein, nach Zusatz von Ammonkarbonat oder Harnstoff auch in asparaginhaltigen, sowie in fetthaltiger und fettfreier Milch.

Harnstoff kann nicht als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden, dagegen sehr wahrscheinlich in geringem Maße Ammonkarbonat. Als Stickstoffquelle sind Harnstoff und Ammonkarbonat bis zu gewissem Grade bei Gegenwart von Dextrose brauchbar, ebenso wahrscheinlich auch Biuret bei Gegenwart von Fleischextrakt. Nitrat und Nitrit waren nicht verwertbar, ebensowenig Glykokoll, Leuzin, Azetamid, Oxamid, Succinimid, Harnsäure, Urethan, Kreatin, Kreatinin, Guanidin, Thioharnstoff und Cyansäure.

Von den Kohlenstoffquellen wird Dextrose bevorzugt; in festen Nährböden wirkt 1 Proz. Dextrose schon wachstumhemmend, in flüssigen Kulturlösungen werden 3 Proz. noch gut vertragen.

Biophysikalische Eigenschaften.

Die Bestimmungen wurden auf Ammon-Agarnährböden gemacht.

Kardinalpunkte der Temperatur:

Minimum der Entwicklung zwischen 3—5°, Optimum zwischen 28—35° bei 32°.

Maximum der Temperatur für Sporenkeimung zwischen 45—47° C.

Maximum der Temperatur für Oidienwachstum zwischen 44—45° C.

Maximum der Temperatur für Sporenbildung zwischen 42—43° C.

Kardinalpunkte der Sauerstoffspannung.

Minimum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung zwischen 1—4, nahe bei 4 mg O im Liter.

Minimum der Sauerstoffspannung für Oidienwachstum zwischen 4—10, näher 4 mg O im Liter Luft.

Minimum der Sauerstoffspannung für Sporenbildung zwischen 4—10, näher 10 mg O.

Maximum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung zwischen 10—15, nahe 10 Atmosphären O.

Maximum der Sauerstoffspannung für Oidienwachstum zwischen 5—10, nahe 5 Atmosphären O.

Maximum der Sauerstoffspannung für Sporenbildung: 1—5 Atmosphären O.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Temperaturen:

a) von 100° C: Sporentötungszeit zwischen 11½—12½ Minuten,

b) von 80° C: Sporentötungszeit zwischen 9—10 Stunden.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Säuren.

a) Sporentötungszeit durch 16 Proz. Schwefelsäure = 50—105 Minuten,

b) Sporentötungszeit durch 16 Proz. Salzsäure oberhalb 10 Minuten.

Sporentötungszeit durch 16 Proz. Salzsäure unterhalb 40 Minuten.

Aufhebung des Wachstums durch Zusatz von 0,01 Proz. $ZnSO_4$ zum Nährboden.

Aufhebung der Sporenbildung durch Zusatz von 0,008 Proz. $ZnSO_4$.

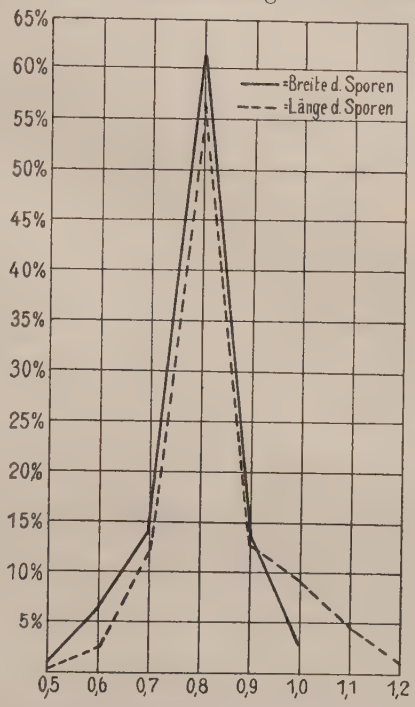
Biochemische Eigenschaften.

Von Eiweißabbauprodukten wurde in 5 Proz. Peptonbouillon + 0,2 Proz. Ammonkarbonat in geringer Menge Indol, in 1 Proz. Peptonbouillon mit Harnstoff oder Ammonkarbonat in deutlich nachweisbarer Menge Schwefelwasserstoff und Trimethylamin gebildet, dagegen kein Ammoniak (?). Gasbildung trat weder auf Zusatz von Kohlehydraten, noch auf Zusatz von

ameisensaurem Natrium ein. Schleimbildung war besonders stark in einigen Wochen alter, mit Ammoniumkarbonat oder Harnstoff versetzter 1-proz. Peptonbouillon. Säurebildung ist wahrscheinlich, zumal auf zuckerhaltigen oder in zuckerhaltigen Nährmedien vorhanden. Iriserscheinung mit Newtons Farbenringen wurde beobachtet, die Farbenringe waren jedoch gewöhnlich wenig deutlich zu sehen. Die Ausscheidung von Calciumkarbonat und Phosphatkristallen in ⅓ D-Agarnährböden mit 2 und mehr Proz. Harnstoff wurde immer beobachtet. Farbstoffbildung wurde nicht bemerkt, ebensowenig Fluoreszenz und Leuchtfähigkeit.

Gelatineverflüssigung trat nach 2—3-jähriger Züchtung ein auf ⅓ D-Gelatine + 0,2 Ammonkarbonat. Amylase (Diastase) und Oxydase konnten nicht nachgewiesen werden, dagegen enthielten alle auf Katalase und Urease untersuchten Bouillonkulturen diese Enzyme. Reduktion von Neutralrot, das dem Ammon-Agar zugesetzt worden war, wurde ebenfalls beobachtet.

Es konnte auf tierphysiologischem Wege weder eine Giftbildung in Bouillonkulturen, noch eine krankheitserregende Eigenschaft der Bakterien selbst festgestellt werden.



Variationskurve der Sporengröße der Spezies „Bac. probatus“ auf Ammon-Agar. Berücksichtigt wurden insgesamt 585 Sporen.

Versuchsmaterial	Anzahl	Länge	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2 µ
Mein Originalstamm	400	Sporen	0	6	47	269	36	27	10	5
St. leubei Beijerinck	100	„ „	0	3	5	24	26	22	17	3
St. pasteurii Beijerinck	60	„ „	1	3	13	29	9	4	1	
St. B_3 Löhnis	25	„ „	1	2	5	11	4	2		
	585	„ „	2	14	70	333	75	55	28	8
	in Prozenten	„	0,34	2,4	11,9	57	12,8	9,4	4,8	1,36

Versuchsmaterial	Anzahl	Breite	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2 µ
Mein Originalstamm	400	Sporen	2	15	48	275	48	12		
St. leubei Beijerinck	100	„ „	1	9	14	48	26	2		
St. pasteurii Beijerinck	60	„ „	2	10	16	29	2	1		
St. B_3 Löhnis	25	„ „	1	4	5	11	3	1		
Gesamtzahl	585	„ „	6	38	83	363	79	16		
	in Prozenten	„	1,2	6,5	14	62	13,5	2,73		

Gezählt wurden nur Sporen, die auf Ammon-Agar vorbehandelt, fortgezüchtet und ausgereift waren.

Harnstoffspaltung.

Gehen wir von 10 Millionen Sporen der verschiedenen Stämme aus, die wir in 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff ein-

impfen, und lassen wir die Kulturen bei 28° C stehen, so beobachten wir bei einer bestimmten Stäbchenzahl auch eine annähernd entsprechende Harnstoffspaltung.

Bei rund 2100 Millionen 1-langer Oidien konnte noch keine Harnstoffspaltung festgestellt werden; bei rund 3600 Millionen 1-langer Oidien waren 36 Proz. des zugesetzten Harnstoffs gespalten, bei 4800 Millionen (von 26 Millionen Sporen ausgehend) 90 Proz. des zugesetzten Harnstoffs. Eine annähernd gleiche Proportionalität der Vermehrungsgröße zur Spaltungsgröße zeigten auch die anderen Stämme unserer Spezies (siehe im Abschnitt über den Vergleich, sowie in der Einleitung).

Literatur.

Abel, R., Bakteriologisches Taschenbuch. Würzburg 1910.
Abderhalden, E., Biochemisches Handlexikon. Berlin 1911/12.
—, Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden. Berlin 1910/11.
Baudet, Fl., Asporogene Milzbrandbazillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 60. 1911. p. 462—480.)
Behrens, Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 13. 1896. p. 1802.
Berghaus, Über die Ammoniakbildung bei einigen Bakterienarten. (Arch. f. Hyg. Bd. 54. 1908. p. 1—32.)
Behring, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 6. 1889. p. 127.
—, Beiträge zur Ätiologie des Milzbrandes. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 7. 1890. p. 173.)
Beijerinck, Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. p. 33 ff.)
Benedict, R. u. Gephart, Fr., Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. 30. 1909. p. 1760; Neubauer-Huppert 1910. p. 567.
Bierema, Die Assimilation von Ammon-Nitrat und Amidstickstoff durch Mikroorganismen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 708.)
Benecke, Bau und Stoffwechsel der Bakterien. 1912.
Billet, Compt. rend. de l'acad. d. scienc. 1885. p. 1252.
Blau, O., Über die Temperaturmaxima der Sporenkeimung und der Sporenbildung, sowie die supramaximalen Tötungszeiten der Sporen der Bakterien usw. [Dissert.] Marburg 1905. (Auch Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. 1906.)
Breed, R., The Determination of the Number of Bakteria in Milk by direkt microscopical Examination. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 30. 1911. p. 337—340.)
Bredemann, G., Untersuchungen über die Variation und das Stickstoffbindungsvermögen des Bac. asterosporus A. M., ausgeführt an 27 Stämmen verschiedener Herkunft. Ein Beitrag zur Speziesfrage der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd, 22. 1908. p. 44—89.)
—, Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung mit besonderer Berücksichtigung des Stickstoffbindungsvermögens dieser Spezies. [Diss.] (Marburg 1908; auch Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 385—568.)
Brodmeyer, A., Über die Beziehung des Proteus vulgaris Hsr. zur ammoniakalischen Harnstoffzersetzung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 18. 1895. p. 380—391.)
Buchner, Longard u. Riedlin, Über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 11. 1887. p. 1 ff.)
Burchard, A., Beiträge zur Kenntnis des Ablaufs und der Größe der durch Micrococcus ureae liquefaciens bewirkten Harnstoffzersetzung. (Arch. f. Hyg. Bd. 36. 1899. p. 264—284.)
Burri, Herfeldt u. Stutzer, Bakteriologisch-chemische Forschungen über die Ursachen der Stickstoffverluste in faulenden organischen Stoffen, insbesondere im Stallmiste und in der Jauche. (Orig. im Journ. f. Landwirtsch. 1894. p. 329—384; Autoref. i. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 1. p. 284—289.)
Cambier, Annal. de micrograph. 1893. p. 322; auch in Miquel 1904. p. 80.
Cazeneuve et Livon, Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 85. 1877. p. 571—574.)
Christensen, Über den Einfluß der Humusstoffe auf die Ureumspaltung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 27. 1910. p. 337—362.)
Cohn, Beiträge z. Biologie d. Pflanzen. Bd. 1. 1872. p. 158—160.

Czapek, Biochemie der Pflanzen. Jena 1905.
—, Saccharophobie, Ref. im Centralbl. f. Bakt. Bd. 26. p. 84. (Orig. in Chiari-Festschrift, von Dittrich, Prag 1908.)
Dieudonné, Arb. a. d. Kais. Gesundh.-Amt. Bd. 11. 1895. p. 508 f.
Duclaux, Traité de chimie biolog. p. 698, 701; auch in Miquel. 1898. p. 75.
Ellis, Beiträge zur Kenntnis der Coccaceen und Spirillaceen. I. Untersuchung über Sarcina, Streptococcus und Spirillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 33. 1902. p. 1 f.; II. Der Nachweis der Geißeln bei allen Coccaceen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I.) I u. II als Dissertation. Marburg 1902.
Erdmann u. Winternitz, Über das Proteinochrom, eine klinisch und bakteriologisch bisher nicht verwertete Farbenreaktion. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16. 1903; München. med. Wochenschr. 1903. p. 982.)
Fischer, A., Die Plasmolyse der Bakterien. (Ber. d. kgl. sächs. Ges. d. Wissensch. Leipzig 1891.)
—, Über die Geißeln. Untersuchungen über Bakterien. (Pringsh. Jahrb. f. wissensch. Bot. Bd. 27. 1894. p. 1 f.)
—, Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl. Jena 1903.
Flügge, Die Mikroorganismen. 3. Aufl. 1896.
Folin, Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn und anderen tierischen Flüssigkeiten. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37. 1902—1903. p. 161; auch in Neubauer-Huppert. 1910. p. 533.)
—, Die vollständige Analyse eines 24-stündigen Urins. (Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. Bd. 5. 1911. p. 281.)
Freudenreich, Annal. de micrograph. T. 3. p. 257.
Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme. Jena 1907.
Garbowski, Über Abschwächung und Variabilität bei Bacillus luteus Smith et Baker und Bacillus tumescens Zopf. [Diss.] Marburg 1907; Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1907. p. 641 f.
Gill, Ailison u. Grindley, Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. 31. p. 1078 f.; auch in Neubauer-Huppert 1910. p. 568.
Gottheil, Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. [Diss.] Marburg 1902; Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. p. 463 f.)
Greene, The soluble Ferments and Fermentation. 1899. p. 287.
Grimme, Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. [Diss.] Marburg 1902; (Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 32. 1902.)
Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. Leipzig 1906.
Harding, The constancy of certain physiological characters in the classification of Bacteria. (Bull. New York agric. exp. Stat. 1910. No. 13.
Heim, Lehrbuch der Bakteriologie. 4. Aufl. 1911.
v. Jaksch, Studien über den Harnstoffpilz. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5. 1881. p. 395.)
Jensen, Die Hautlinien des natürlichen Bakteriensystems. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1909. p. 305—346.)
Jorns, A., Über Bakterienkatalase. (Arch. f. Hyg. Bd. 57. 1908. p. 134—162.)
Kellner, O., Über das Verhalten des Harnstoffs im Ackerboden. (Landw. Jahrb. Bd. 15. 1886. p. 712—717.)
Kiesel, A., Über den fermentativen Abbau des Arginins in Pflanzen. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75. 1911. p. 177 f.)
Klein, A., Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 27. 1900. p. 834.)
—, Die physiologische Bakteriologie des Darmkanals. (Arch. f. Hyg. Bd. 45. 1902. p. 117 f.)
—, Arch. f. Hyg. Bd. 59. 1906. p. 283.
—, Botanische Bakterienstudien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 6. 1889. p. 313.)
Kobert, Enzyme wirbelloser Tiere. (Pflüg. Arch. Bd. 99. 1903. p. 131.)
Kolle u. Wassermann, Handbuch d. pathogenen Mikroorgan. 1. Aufl. Jena.
Kossowicz, A., Einführung in die Agrikulturmykologie. 1. Bodenbakteriologie. Berlin 1912.
Kruse, Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910.
Koch, Jahresber. f. d. F. i. d. L. v. d. Gärungsorganism.
Ladureau, Compt. rend. de l'acad. des scienc. de Paris. T. 99. 1884. p. 897.
Lea, Sh., Some notes on the isolation of a soluble urea from the Torula urea. (Journ. of Physiol. Vol. 10. 1890. p. 226.)

Leube, Über die ammoniakalische Harngärung. (Virchows Arch. Bd. 100. 1885. p. 585 f.; Deutsch. med. Ztg. Bd. 7. 1885. p. 379. Autoref.)
— u. Graser, Sitzungsber. Erlangen 1885. p. 12.
Lehmann u. Neumann, Atlas u. Grundriß der Bakteriologie. 4. Aufl. 1907. 5. Aufl. 1911/12.
Lafar, Handb. d. techn. Mykologie. Jena 1904—07.
Liebert, The decomposition of uric acid by bacteria. (Acad. d. Wetenschapen Amsterdam. 1909. p. 61.)
Löhnis, Ein Beitrag zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchung I. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12. 1904. p. 452.)
—, Zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchung II. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 7.)
—, Über die Zersetzung des Kalkstickstoffs. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 397.)
—, Beiträge zur Kenntnis der Stickstoffbakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 717 f.)
—, Handbuch d. landwirtschaftl. Bakteriol. Berlin 1910.
—, Praktikum d. landwirtschaftl. Bakteriol. Berlin 1911.
— u. Kuntze, (Centralbl. f. Bakt. Bd. 20. 1908. p. 680 f.)
Lunkewicz, Eine Farbenreaktion auf die salpetrige Säure der Kulturen der Cholerabazillen und einiger anderer Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. 1897. p. 945—949.)
Macé, Traité practique de Bactériologie. 5. éd. Paris 1904.
Maaßen, Arb. a. d. Kais. Gesundh.-Amt. Bd. 15. 1899. p. 512.
Machida, Bull. centr. agric. exp. stat. Japan. T. 1. 1907. p. 1.
Marchal, Bull. de l'Acad. de Belg. Sér. 3. T. 25. 1898. p. 766; nach Löhnis 1910.
Meyer, A., Studien über die Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Bakterien, ausgeführt an Astasia asterospora A. M. et Bac. tumescens Zopf. (Flora. Ergänzungsbd. Bd. 84. 1907. p. 185.)
—, Über Geißeln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien. (Flora. Bd. 86. 1899. p. 429.)
—, Notiz über das Verhalten der Sporen und Fettpfropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydratlösung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 29. 1901. p. 809.)
—, Die Grundlagen und die Methoden für die mikroskopische Untersuchung von Pflanzenpulvern. Jena 1901.
—, Über die Verzweigung der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 30. 1901. p. 49.)
—, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903.
—, Erstes mikroskopisches Praktikum. 2. Aufl. Jena 1907.
—, Der Zellkern der Bakterien. (Flora. Bd. 98. 1908. p. 335.)
—, Apparat für die Kultur von anaëroben Bakterien und für die Bestimmung der Sauerstoffminima der Bakterienspezies für Keimung, Wachstum und Sporenbildung der Bakterienspezies. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. 1905.)
—, Apparat für die Kultur von Bakterien bei hohen Sauerstoffkonzentrationen, sowie zur Bestimmung der Sauerstoffmaxima der Bakterienspezies und der Tötungszeiten bei höheren Sauerstoffkonzentrationen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. p. 386—398.)
—, Bemerkungen über Aerobiose und Anaërobiose. (Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 49. 1909. p. 305.)
—, Notiz über das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop. (Arch. f. Protistenk. Bd. 24. 1911. p. 78.)
—, Die Zelle der Bakterien. Jena 1912.
Migula, System der Bakterien. Bd. 1 u. 2. 1897. 1900.
Miquel, De la présence dans l'air du ferment de l'urée. (Bull. soc. chim. de Paris. T. 29. 1878. p. 387; T. 31. 1879. p. 391.)
—, Sur le ferment de l'urée soluble. (Compt. rend. de Paris. T. 111. 1890. p. 397.)
—, Annuaire de Montsouris. 1882. p. 464 f.
—, Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. (Annal. de microgr. T. 1. 1889; T. 2. 1889/90; T. 3. 1890/91; T. 5. 1893; T. 7. 1895; T. 8. 1896; T. 9. 1897.)
—, Étude de la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. Paris 1898.

—, Die Vergärung des Harnstoffes, der Harnsäure und der Hippursäure. (Lafars Handb. d. techn. Mykol. Bd. 3. 1904. p. 71—85.)
Moll, Über die Antiurease. (Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2. 1902. p. 344.)
Musculus, Sur un papier réactif de l'urée. (Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 78. 1874. p. 132.)
—, Über die Gärung des Harnstoffs. (Pflüg. Arch. Bd. 12. p. 214; Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 83. 1876. p. 333.)
MacNeal, Latzer and Kerr, The fecal Bacteria of healthy men. (Journ. of infect. Dis. Vol. 6. 1909. p. 123—169, 571—609.)
Neide, Die Alkoholentfärbung der nach Gram gefärbten Bakterien als Speziesdiagnose, in Verbindung mit einer Untersuchung der für die Gramfärbung in Betracht kommenden Faktoren. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904.)
—, Botanische Beschreibung einiger sporenbildenden Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12. 1904. p. 1 f.; auch Diss. Marburg.)
Neubauer-Huppert, Analyse des Harns. Tl. 1. 1910.
Omelianski, Zur differentiellen Diagnostik der Mikroben. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 34. 1903. p. 1 f.)
—, Ameisensaures Natron enthaltende Bouillon als Nährboden zur differentiellen Diagnostik der Mikroben. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 673.)
Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. 3. Aufl. Leipzig 1909.
Pasteur, Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 50. 1860. p. 849—854; Annal. de Chim. et Phys. Sér. 3. T. 64. 1862. p. 56—57.)
— et Joubert, Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 83. 1876. p. 1 f.
Pateur, Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 58. 1864. p. 142—150.
Peju, G., et Rajat, H., Note sur la polymorphisme des bactéries dans l'urée. Ref. in Kochs Jahresbericht Bd. 17. 1906. p. 60. (Orig. in Compt. rend. soc. biol. T. 61. p. 477.
Pfeffer, Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Tl. 1. Leipzig 1897. Tl. 2. 1904.
Petri u. Maaßen, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh.-Amt. Bd. 8. 1893. p. 318.
Pringsheim, Die Variabilität niederer Organismen. Berlin 1910.
Porcher et Panisset, Sur la recherche de l'indol etc. (Compt. rend. soc. biol. T. 70. 1911. p. 369 f.)
Rahn, O., Die Verwendbarkeit von Kurven zur Deutung biochem. Vorgänge. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. 1910. p. 111.)
—, Die Stundengärleistung der Einzelzelle von Bacterium lactis acidi. (Centrallb. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. p. 375 f.)
—, The fermenting capacity of the average single cell of Bacterium lactis acidi. (Technical Bull. East Lansing Michigan 1912. No. 11.)
Reichert, Sichtbarmachung der Geißeln und Geißelbewegung der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. 1909. p. 14 f.)
Rochaix, Sur quelques particularités des urobactéries. (Annal. de la soc. Linn. de Lyon. Bd. 57. 1911. p. 205—207.)
— et Dufourt, Contribution à l'étude des urobactéries. (Compt. rend. soc. biol. T. 69. 1910. p. 312—314.)
—, Remarques sur la réaction de Neutral-Rot. (Ebenda.)
Rona, Nachweis und Bestimmung der Eiweißabbauprodukte im Harn und in Faeces. (Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. 3. 2. 1910. p. 765.)
Rothberger, Differentialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 24. 1898. p. 513. Bd. 25. p. 15 u. 69.)
Rubner, Energieverbrauch im Leben der Mikroorganismen. (Arch. f. Hyg. Bd. 48. 1904. p. 260 f.)
Söhngen, Ureumspaltung bei Nichtvorhandensein von Eiweiß. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 91 f.)
Semal, Annal. de pharm. T. 4. 1898. p. 279; ref. Jahresber. d. Gär. Bd. 9. p. 205.
Severin, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 3. 1897. p. 713.)
—, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 617 f.
Shibata, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5. 1904. p. 388.
Schultz u. Julius, Farbstofftabellen. 1897.
Takeda, Der Nachweis von Trimethylamin im Harn. (Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 129. 1909. p. 82—88.)
Takeuchi, Journ. of coll. agric. Tokyo. Vol. 1. No. 1. 1909.
Telle u. Huber, Kritische Betrachtungen über die Methoden des Indolnachweises in Bakterienkulturen usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. 1911. p. 78.)

van Tieghem, Recherches sur la fermentation de l'urée et de l'acide hippurique. Thèse No. 256 de Paris. 1864; Compt. rend. de l'Acad. de Paris. T. 58. 1864. p. 210—264.)
Vahle, Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakteriaceen und Bakteriaceen, sowie die Rhodobakteriaceen und Spirillaceen. [Diss.] Marburg; Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 25. 1909. p. 178—260.
Viehoever, A., Über den Nachweis von Chitin bei Bakterien. (Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellsch. Bd. 30. p. 443—452.)
—, Botanische Untersuchung harnstoffspaltender Bakterien usw. (Auszug) Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellschaft 1913. Bd. 31. Heft 6. p. 285—289.
Warington, The chemical actions of some microorganisms. (Ref. i. Centralbl. f. Bakt. Bd. 6. 1888. p. 498.)
Winternitz, Über das Verhalten der Milch und ihrer wichtigsten Bestandteile bei der Fäulnis. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16.)
Winterberg, Zur Methodik der Bakterienzählung. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 29. 1898. p. 75.)
Wund, Feststellung der Kardinalpunkte der Sauerstoffkonzentration für Sporenkeimung und Sporenbildung einer Anzahl einer Reihe in Luft ihren ganzen Entwicklungsgang durchführender Bakterienspezies. [Diss.] Marburg 1906; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 42. 1906. p. 97.
Zopf, Die Spaltpilze. Breslau 1883.
—, I. Zur Kenntnis der Organismen des amerikanischen Baumwollsaatmehls. II. Bacterium vernicosum. Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen. Heft 1. Leipzig 1892. p. 91; Ref. in Kochs Jahresber. d. Gärungsorgan. Bd. 3. 1892. p. 91—92.

Einzell-Kultur.

Burri, R, Das Tuscheverfahren. Jena 1909.
Lindner, Mikrosk. Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 4. Aufl. Berlin 1905. p. 201 ff.
Schouten, S. L., Een methode voor het maken van reinculturen uitgaande van één onder het microscop geisoleerde cel. (Handel. v/h. 7e Nederl. Nat. en Gen. Congres, geh. te Haarlem 1899.)
—, On pure cultures of Saprolegniaceen. (These Proceedings 1901. March 30.)
—, Reinculturen uit één ondre het mikroskop geisoleerde cel. [Proefschrift.] Utrecht 1901.
—, Reinkulturen aus einer unter dem Mikroskop isolierten Zelle. (Zeitschr. f. wiss. Mikr. u. f. mikr. Technik. Bd. 22. 1905. p. 10.)
—, Pure cultures from a single cell, isolated under the microscope. (Proceed. of the Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam. 1911.)

Tafelerklärung.

Alle Objekte 2400-fach vergrößert.

Fig. 1—3. Sporen verschiedener Form und Größe; frei oder in Hüllen.
Fig. 1. 3 Wochen alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 2. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur (1. Strichgeneration).
Fig. 3. 2 Wochen alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 4—8. Sporenkeimung polar und äquatorial.
Fig. 4—5. 6 Stunden alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 6—7. 6 Stunden alte Harnstoff-Mineralagarkultur.
Fig. 8. 5½ Stunden alte Ammon-Agarkultur (Geißelfärbung).
Fig. 9—11. Leere Hüllen, aus denen die Spore herausgetreten ist.
Fig. 9. 4 Wochen alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 10—11. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 12—23. Oidien verschiedener Form und Größe.
Fig. 12—14. Oidien auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff. 77. Kulturgeneration.
Fig. 15—17. 20 Stunden alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 18—19. 8 Tage alte Nährgelatine + 0,1 Proz. Na_2CO_3; 8 Tage alte Nährgelatine + 2 Proz. Harnstoff + 0,3 Proz. Ammon. carb.
Fig. 20—22. 2 Tage alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 23. 2 Tage alte Ammon-Agarkultur. 130. Strichkulturgeneration, Geißelfärbung.
Fig. 24—33. Sporangien verschiedener Form und Größe.

Fig. 24. Sporangium mit 2 Sporen. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 25. 4 Wochen alte ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Harnstoffkultur. 17. Strichkulturgeneration des aus einer einzelnen Spore isolierten Stammes.
Fig. 26—27. 4 Wochen alte Kultur ⅓ D-Agar + 1 Proz. Na_2CO_3.
Fig. 28. 4 Tage alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 29. 8 Tage alte Harnstoff-Mineralagarkultur.
Fig. 30. 8 Tage alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 31. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur. 1 Woche bei 42° gewachsen, 3 Wochen bei 20° gestanden.
Fig. 32. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 33. 4 Tage alte Ammon-Agarkultur. 160. Strichkulturgeneration, Geißelfärbung.
Fig. 34—39. Hemangien-Sporangienreste.
Fig. 34—37. 2 Wochen alte Ammon-Agarkultur oder Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 38—39. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur (Geißelfärbung).
Fig. 40—41. Einzellige Fäden.
Fig. 40. 5 Tage alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 41. 4 Wochen alte Bouillon + 0,1 Proz. Na_2CO_3.
Fig. 42—44. Schwellformen (Involutionsformen).
Fig. 42. 8 Tage alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 43. 8 Tage alte ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff.
Fig. 44. 4 Wochen alte Nährlösung I + 2 Proz. Harnstoff.
Fig. 45—49. Körnchen (Kern) und Vakuolen (Fig. 49) — Färbung in Oidien nach Zusatz von 10 Proz. Methylenblau.
Fig. 45—46. 3 Tage alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 47. 5 Tage alte Nährgelatine alkalisch (0,1 Proz. Na_2CO_3).
Fig. 48—49. 11 Tage alte D-Gelatine + 2 Proz. Harnstoff + 0,3 Proz. Ammon. carb.
Fig. 50. Mikroidien. 2 Monate alte Bouillonkultur.
Fig. 51. Degenerationsformen mit Inhaltskörpern. 2 Tage alte bei 42° gezüchtete Ammon-Agarkultur.
Fig. 52—58. Geißelfärbung verschieden alter Kulturen.
Fig. 52. 6 Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar.
Fig. 53. 30½ Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar.
Fig. 54. ca. 50 Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar — Stamm Urobac. Leubei.
Fig. 55. 78½ Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar.
Fig. 56. 1 Monat alte Kultur auf Ammon-Agar.
Fig. 57. 6 Monate alte Kultur auf Ammon-Agar.
Fig. 58. ca. 60 Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar.
Fig. 59. ca. 70 Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar. Kultur stand 2 Stunden bei 60°.
Fig. 60—62. Geißelzöpfe auf oft übergeimpften Ammon-Agarkulturen.
Fig. 63. Plasmolyse. 3 Tage alte Ammon-Agarkultur (10 Proz. NaCl).
Fig. 64. Sporen, Stäbchen, Sporangium im Dunkelfeld.

Lebenslauf.

Geboren wurde ich, Arno Viehoever, am 3. November 1885 zu Wiesbaden als Sohn des Kaufmanns Jos. Viehoever. Ich bin katholisch und preußischer Staatsangehöriger. Im Jahre 1901 erwarb ich auf dem Wiesbadener Realgymnasium die Berechtigung zum einjährig-freiwilligen Dienst und widmete mich dann der pharmazeutischen Laufbahn. Am 22. März 1904 bestand ich das pharmazeutische Vorexamen. Im Sommersemester 1905 war ich in München und vom Wintersemester 1906 ab in Marburg. Am 12. Mai 1908 bestand ich das pharmazeutische Staatsexamen, am 8. Mai 1913 die Hauptprüfung für Nahrungsmittelchemiker und am 2. August 1913 das Rigorosum. Insgesamt war ich 9 Semester immatrikuliert und 3 Semester als Hörer inskribiert. Vom Jahre 1909—1913 war ich Assistent im Botanischen Institut zu Marburg und während dieser Zeit mit der vorliegenden Arbeit beschäftigt. In der Zeit vom Rigorosum bis zur Promotion hielt ich mich vorwiegend in Heidelberg auf.

Meinen akademischen Lehrern, insbesondere Herrn Geheimrat Meyer spreche ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aus.

Fürstlich priv. Hofbuchdruckerei (F. Mitzlaff)
Rudolstadt.